

**T-Zellrezeptor abhängige Verteilungsmuster
von Onkogen transduzierten T-Zellen im Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Juliane Wannemacher

Aus dem Fachbereich der Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität

Gießen

Institut für Veterinär-Pathologie

Prof. Dr. C. Herden

und

aus dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang- Goethe-Universität

Frankfurt am Main

Dr. Senckenbergisches Institut für Pathologie

Prof. Dr. M.-L. Hansmann

**T-Zellrezeptor abhängige Verteilungsmuster von Onkogen transduzierten T-Zellen
im Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Juliane Wannemacher

Tierärztin aus Mainz

Gießen, 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Ch. Herden

Prof. Dr. M.-L. Hansmann

Tag der Disputation: 07.07.2017

Schriftliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze der wissenschaftlichen Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Juliane Wannemacher

„Das Außerordentliche geschieht nicht auf glattem, gewöhnlichem Wege“

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	T-Lymphozyten.....	4
2.1.1	T-Zell Entwicklung und Selektionsmechanismen	4
2.1.2	T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und ihre Untergruppen.....	6
2.1.3	T-Zell Rezeptor.....	8
2.1.3.1	Aufbau des T-Zell Rezeptors	8
2.1.3.2	Aktivierung naiver T-Zellen und intrazelluläre Signalkaskaden .	9
2.1.4	T-Zell-Homöostase.....	12
2.1.4.1	Klonales Konkurrenz-Modell	12
2.1.4.2	Die Rolle des klonalen Konkurrenz-Modells in der Lymphomagenese	14
2.2	Periphere T-Zell Lymphome.....	14
2.2.1	Das ALK positive anaplastische großzellige Lymphom (ALK ⁺ ALCL)	15
2.2.2	Anaplastische Lymphomkinase	16
2.2.2.1	NPM-ALK vermittelte Signalwege im ALCL.....	16
2.2.3	Murine Modelle des ALK ⁺ ALCLs.....	18
2.3	Lymphome in der Veterinärmedizin	20
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	Antikörper	23
3.1.2	Verwendete Bakterien	25
3.1.3	Zelllinien und primäre Zellen	25
3.1.4	Verwendete Plasmide und Vektoren.....	26
3.1.5	Mausstämme.....	26
3.2	Versuchsplanung	26
3.3	Versuchsplanung der in-vitro CTLL2-Versuche	27
3.4	Versuchsplanung zur Untersuchung der Genexpressionsprofile	29
3.5	Versuchsplanung der in-vivo-Versuche.....	30
3.6	Molekularbiologische Techniken	31
3.6.1	Gammaretrovirale Vektoren	31
3.6.2	Bakterientransformation	32
3.6.3	Plasmidpräparation	33

3.6.4	Isolation von DNA aus Blut, Gewebe und Zellsuspensionen	33
3.6.5	Western Blot	33
3.6.5.1	Lyse von Zellen.....	33
3.6.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Zelllysate.....	34
3.6.5.3	Transfer der Proteine auf eine Blottingmembran (Elektro- Blotting)	34
3.6.5.4	Immundetektion durch Chemilumineszenz	34
3.6.6	Genexpressionsprofile	35
3.7	Zellkulturarbeiten.....	35
3.7.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	35
3.7.2	Kultivierung von adhärenenten Zellen	36
3.7.3	Kultivierung von Suspensionszellen	36
3.7.4	Zellzahlbestimmung.....	36
3.7.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
3.7.6	Isolierung von primären murinen T-Zellen	37
3.7.7	Stimulierung isolierter primärer murinen T-Zellen mit monoklonalem TCR	37
3.7.8	Transfektion und Produktion ecotroper Viruspartikel	38
3.7.9	Ermittlung der Transduktionseffizienz der produzierten ecotropen Viruspartikel auf SC1 Zellen	39
3.7.10	Aufkonzentrieren von Vektorüberständen.....	40
3.7.11	Retrovirale Transduktion mit Retronektin beschichteten Platten.....	40
3.8	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	41
3.8.1	Aufbereitung von Vollblut für die Antikörperfärbung.....	41
3.8.2	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen zur FACS Analyse	41
3.8.3	Detektion extrazellulärer Antigene in Einzelzellsuspensionen	42
3.8.4	Intrazelluläre Antikörperdetektion von Einzelzellsuspensionen	42
3.8.5	Apoptose Assay mittels FACS-Analyse.....	42
3.8.6	Intrazelluläre Detektion von phosphorylierten Proteinen	42
3.8.7	Sortieren von Zellpopulationen.....	43
3.9	Tierexperimentelle Methoden.....	43
3.9.1	Tierhaltungsbedingungen	43
3.9.2	Transplantation von OT1- und P14-Zellen	43
3.9.3	Blutabnahme	44
3.9.4	Tötung und Sektion der Versuchstiere	44

3.9.5	Histologische Untersuchung	44
3.9.6	In-vivo-Biolumineszenzmessungen	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Analyse der zytotoxischen T-Zelllinie CTLL2	46
4.1.1	Transduktionseffizienzen transduzierter CTLL2-Langzeitkulturen.....	46
4.1.2	Entwicklung der GFP-Expression in transduzierten CTLL2-Langzeitkulturen	47
4.1.3	NPM-ALK transduzierte zytotoxische T-Zellen gehen in Apoptose.....	49
4.1.4	Ausbildung von zwei GFP-positiven Zellpopulationen	50
4.1.5	Expression von NPM-ALK in GFP-positiver Zellpopulation	50
4.1.6	Markerexpression von NPM-ALK transduzierten CTLL2.....	52
4.1.7	Aktivierung von NPM-ALK vermittelten Signalwegen in NPM-ALK transduzierten CTLL2	53
4.2	Genexpression muriner T-Zellen nach Transduktion mit NPM-ALK	55
4.3	Murines Transplantationsmodell	57
4.3.1	TCR-monoklonale Spenderzellen und Transduktionseffizienz	57
4.3.2	Repopulation des T-Zelltransplantats im Blut der Empfängertiere	59
4.3.2.1	Anteil transgener T-Zellen im Blut	60
4.4	In-vivo-Visualisierung der transgenen T-Zellen mittels Biolumineszenz	61
4.4.1	Zeitlicher Ablauf der BLI-Messungen.....	62
4.4.2	Steigende biolumineszente Signale können mit der Entstehung eines Tumors assoziiert werden.....	64
4.4.3	NPM-ALK transduzierte T-Zellen mit monoklonalem TCR zeigen keine gleichen Verteilungsmuster in der BLI.....	66
4.4.4	Lymphome entstehen im Bereich des höchsten BLI Signals.....	69
5	Diskussion.....	74
5.1	Einfluss der NPM-ALK Überexpression auf murine T-Zellen	74
5.2	TCR-abhängige Verteilungsmuster NPM-ALK transduzierter T-Lymphozyten im Mausmodell	77
5.3	Das verwendete Mausmodell als Modell für das humane ALK ⁺ ALCL	80
5.4	Kritische Betrachtung und Einschränkung des verwendeten Mausmodells.....	81
6	Schlussbetrachtung	84
7	Zusammenfassung.....	85
8	Summary	86
9	Abbildungsverzeichnis	87
10	Tabellenverzeichnis	89

11	Abkürzungsverzeichnis	90
12	Literaturverzeichnis	93
13	Anhang	108
13.1	Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	108
13.2	Verwendete Puffer und zusammengesetzte Lösungen	110
13.3	Verwendete Geräte	111
13.4	Verbrauchsmaterial.....	113
13.5	Kommerzielle Kits.....	114
13.6	Medien.....	115
13.7	Genotyp-Schlüssel E.coli.....	115
13.8	Legende Genexpressionsdaten	118
13.9	Plasmidkarten	119
	Danksagung.....	121

1 Einleitung

Periphere T-Zell Lymphome (peripheral T-cell lymphoma, PTCL) oder auch reife T-Zell Lymphome (mature T-cell lymphoma, MTCL) stellen eine heterogene und seltene Form der Non-Hodgkin Lymphome beim Menschen dar. Mittlerweile wurde eine Vielzahl an Onkogenen identifiziert, die in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von reifen T-Zell Lymphomen stehen. Jedoch treten MTCLs wesentlich seltener auf als die unreifen T-Zell Leukämien. Dies könnte darauf zurück zu führen sein, dass reife T-Zellen strengen homöostatischen Mechanismen unterstehen, wie dem klonalen Konkurrenz-Modell. Als Teil der normalen T-Zell Homöostase trägt das klonale Konkurrenz-Modell dazu bei, die Diversität des T-Zell-Repertoires aufrecht zu erhalten. Nach diesem Modell konkurrieren verschiedene T-Zell Klone um sp-MHCs (selbst Peptid-Haupthistokompatibilitätskomplex), so genannte stimulatorische Nischen. Dies führt dazu, dass T-Zellen in Abhängigkeit ihres T-Zell Rezeptors (T-cell receptor, TCR) unterschiedliche stimulatorische Nischen besetzen und die Diversität des T-Zell Pools sowie die Polyklonalität der T-Zellen aufrechterhalten bleibt. Die klonale Konkurrenz scheint ebenso einen entscheidenden Einfluss auf die Lymphomagenese von reifen T-Zellen zu nehmen. So zeigte eine Studie, dass polyklonale reife T-Zellen resistent sind gegenüber der Transformation durch T-Zell Onkogene. Hierzu wurden reife T-Zellen mit bekannten T-Zell Onkogenen transduziert und anschließend in lymphopenische Mäuse transplantiert. Auch nach einer Beobachtungszeit von über 500 Tagen bildeten die Empfängertiere keine Tumore aus (1). In einer weiteren Studie zeigte die retrovirale Transduktion von Onkogenen in T-Zellen mit monoklonalem TCR, wie OT1- oder P14- Zellen, eine Transformation der reifen T-Zellen. Alle lymphopenischen Empfängertiere erkrankten nach spezifischen Latenzzeiten an Lymphomen (2). Dies zeigt, dass reife T-Zellen nicht per se eine Transformationsresistenz gegenüber T-Zell-Onkogenen aufweisen, jedoch möglicherweise eine polyklone T-Zell-Population aufgrund ihrer TCR-Diversität und der damit verbunden klonalen Konkurrenz, das Auswachsen eines prä-malignen Klons unterdrücken kann. So können T-Zellen mit einem monoklonalen TCR, welche keine TCR-Diversität aufweisen und somit keiner klonalen Konkurrenz unterstehen, ungehindert auswachsen.

Eines der verwendeten T-Zell Onkogene dieser Studien ist das Onkogen NPM-ALK (Fusionsonkogen bestehend aus Nucleophosmin und der anaplastischen Lymphomkinase) NPM-ALK entsteht beim Menschen aufgrund einer Chromosomentranslokation, Chromosom 2 und Chromosom 5 betreffend und ist in über 80% der ALK⁺ ALCL (anaplastische Lymphomkinase positives anaplastisches großzelliges Lymphom) Fälle nachweisbar. Das Modell des retroviralen Gentransfers von NPM-ALK in TCR-monoklonale T-Zellen mit anschließender Transplantation in lymphopenische Empfängertiere hat sich als ein vielversprechendes Mausmodell für das Studium der Pathogenese des ALK⁺ ALCL erwiesen. Allerdings war das Onkogen NPM-ALK über den gesamten Versuchsaufbau von 24 Wochen, nach intrazellulärer Antikörperfärbung und anschließender Durchflusszytometrie, nicht im Blut nachweisbar. Auch bei der Untersuchung der Organe der transplantierten Mäuse vor Ausbildung klinisch manifester Tumore, war das Onkogen nach intrazellulärer Antikörperfärbung in der FACS-Analyse (Fluorescence-activated Cell Sorting, deut. Durchflusszytometrie) nicht detektierbar (nicht veröffentlichte Ergebnisse der AG Newrzela, Frankfurt).

Um die Lymphomagenese des ALK⁺ ALCLs in Bezug auf die Populationsdynamiken genauer zu betrachten, wurde das bereits beschriebene Mausmodell modifiziert. Hierzu wurde in die bislang verwendeten gammaretroviralen Vektoren das Gen der Firefly-Luciferase kloniert. Das Substrat Luciferin wird durch das Enzym Luciferase unter Abspaltung von Energie umgesetzt. Die hierbei entstehende biolumineszente Strahlung kann durch spezielle bildgebende Verfahren in-vivo analysiert werden. Nach retroviralem Gentransfer in TCR-monoklonale OT1-Zellen konnte somit mittels Biolumineszenzbildgebung das Repopulierungsverhalten der modifizierten OT1-Zellen in lymphopenischen Mäusen verfolgt werden. Die mit dem Kontrollgen (T-Sapphire mit Luciferase) transduzierten OT1-Zellen repopulierten in den lymphopenischen Empfängertieren und waren über dem gesamten Versuchsverlauf in der Biolumineszenzmessung zu detektieren. Im Gegensatz zu den mit dem Kontrollgen transplantierten Mäusen konnten die Onkogen (NPM-ALK mit Luciferase) transduzierten T-Zellen in-vivo in der biolumineszenten Bildgebung bis zur Entstehung der Lymphome nahezu nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise schienen die durch NPM-ALK induzierten Lymphome in den Empfängertieren ihren Ursprung im poplitealen Lymphknoten zu nehmen.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, verschiedene NPM-ALK-transduzierte TCR-monoklonale T-Zell-Populationen (OT1 und P14) auf mögliche TCR-abhängige Verteilungsmuster in den Empfängertieren in der In-vivo-Biolumineszenzbildgebung zu untersuchen. Aufgrund dieser In-vivo-Untersuchungen sollten Rückschlüsse gezogen werden, ob maligne entartete T-Zellen mit unterschiedlichem TCR zum klonalen Auswachsen auf verschiedene lymphatische Regionen angewiesen sind, bzw. angewiesen sind auf die Interaktion mit ihrem exklusiven sp-MHC (stimulatorische Nische). Da es bisher im Mausmodellen nicht möglich war NPM-ALK mittels intrazellulärer Färbung mit anschließender FACS-Analyse im Blut oder in den Organen - vor Ausbildung manifester Tumore - nachzuweisen, wurde zusätzlich in-vitro der Effekt von NPM-ALK auf eine IL2 (Interleukin2) abhängige zytotoxische T-Zelllinie (cytotoxic T-cell line 2, CTLL2) untersucht.

Für die In-vivo-Versuche wurden OT1- und P14-T-Zellen aus OT1- und P14-transgenen Mäusen isoliert. Die isolierten TCR-monoklonalen T-Zellen wurden mittels retroviralem Gentransfer mit dem Onkogenvektor, NPM-ALK gekoppelt an Luciferase, oder dem Kontrollvektor, T-Sapphire gekoppelt an Luciferase, transduziert. Im Anschluss wurden die genmodifizierten T-Zellen in Recombination-activation gene 1 (Rag1)-defiziente Empfängermäuse transplantiert. Die Empfängertiere wurden bis zur Entstehung von klinisch manifesten Lymphomen einer wöchentlichen Biolumineszenzmessung unterzogen. Klinisch erkrankte Tiere wurden euthanasiert und die NPM-ALK-induzierten Tumore wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von NPM-ALK und spezifische Marker des ALK⁺ ALCLs, wie ICOS (inducible T-cell Co-Stimulator) und CD30 (Cluster of differentiation), untersucht. Die ermittelten Biolumineszenzdaten wurden ausgewertet und auf mögliche TCR abhängige Verteilungsmuster im Körper der Empfängertiere untersucht.

Für die in-vitro-Untersuchungen wurde NPM-ALK an GFP (grün fluoreszierendes Protein) gekoppelt in CTLL2 transduziert. Als Kontrollzellen agierten CTLL2, die nur mit GFP transduziert waren. Die genmodifizierten Zellen wurden systematisch mittels Antikörperfärbung und anschließender FACS-Analyse auf ihren Phänotypen sowie den Phosphorylierungsstatus spezifischer Schlüsselproteine, wie STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), analysiert. Ebenfalls wurde die Apoptoserate frisch transduzierter CTLL2 mittels FACS-Analyse ermittelt.

2 Literaturübersicht

2.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten gehören zum spezifischen Immunsystem. Sie exprimieren CD3 (Cluster of differentiation) und besitzen einen membranständigen T-Zell Rezeptor (TCR). Dieser setzt sich in etwa 95% der zirkulierenden T-Zellen aus einer α - und β -Kette (TCR $\alpha\beta$) zusammen. Nur die Minderheit der T-Zellen zeigt die Expression eines TCR $\gamma\delta$ (3). T-Lymphozyten sind nicht in der Lage, freie Antigene oder auch Selbstpeptide zu erkennen. Hierzu müssen diese durch antigenpräsentierende Zellen (APC), gebunden an Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) präsentiert werden (4). Nur dann wird die T-Zelle aktiviert und kann ihre Funktion ausführen. Der Begriff der T-Zelle bezieht sich im nachfolgenden auf T-Zellen mit einem TCR $\alpha\beta$, auf welchen der Schwerpunkt in dieser Arbeit liegt.

2.1.1 T-Zell Entwicklung und Selektionsmechanismen

Lymphoide Vorläufer-Zellen (common lymphoid progenitor, CLP) entstehen während der Fetalzeit im Knochenmark (KM). Sie wandern über den Blutweg in den Thymus ein und entwickeln sich dort über mehrere Entwicklungsschritte zu reifen T-Zellen (5). Die in den Thymus eingewanderten T-Zellvorläufer zeigen keine Expression von CD4 und CD8. Sie werden als doppelt negative Thymozyten (DN) bezeichnet. Die DN-Thymozyten durchlaufen vier Entwicklungsstufen, welche bestimmt werden durch die Expression von CD44 und CD25: DN1 (CD44⁺, CD25⁻), DN2 (CD44⁺, CD25⁺), DN3 (CD44⁻, CD25⁺) und DN4 (CD44⁻, CD25⁻) (6). Ab dem DN2-Stadium kommt es zur Entwicklung des TCRs. Zunächst wird durch die Aktivität der Rekombinasen Rag1 (Recombination-activation gene 1) und Rag2 das Gen für den TCR β rearrangiert (7–9). Der prä-TCR α , der erstmals im DN3-Stadium exprimiert wird, bildet gemeinsam mit der TCR β -Kette den prä-TCR $\alpha\beta$. Dieser prä-TCR $\alpha\beta$ bildet an der Zelloberfläche einen Komplex mit CD3/ ζ (10,11).

Die Ausbildung des prä-TCR ist ein wichtiger Schritt in der Entwicklung der T-Zellen, nur Zellen, welche einen prä-TCR ausgebildet haben erreichen das Stadium DN4 (12). Diese Zellen beginnen die Co-Rezeptoren CD4 und CD8 zu exprimieren und rearrangieren die Gene für den TCR α (13). Man spricht von doppelt positiven Thymozyten (DP). DP-Thymozyten durchlaufen im Thymus die sogenannte zentrale Selektion oder zentrale Toleranz. Hierbei werden drei verschiedene Selektionsmechanismen unterschieden, welche abhängig sind von der Affinität des TCRs an Selbstpeptid-MHCs (sp-MHCs) zu binden. Kann der TCR einer Zelle

nicht oder nur unzureichend sp-MHC-Moleküle binden, bekommt die Zelle kein Überlebenssignal und geht in Apoptose (Tod durch Vernachlässigung) oder den Zustand der Anergie über (14). Zellen deren TCR eine besonders starke Bindung mit sp-MHCs eingehen, könnten selbstreaktive T-Zellen werden. Auch diese Zellen gehen in Apoptose, sie werden negativ selektiert (15–17). Nur T-Zellen, die sp-MHCs erkennen und nicht zu stark binden, bekommen ein Überlebenssignal. Sie werden positiv selektiert, reifen zu einfach positiven (EP) CD4 oder CD8 T-Zellen heran und verlassen den Thymus über Blut- und Lymphgefäße in die Peripherie (5).

Nachdem die einfach positiven T-Zellen den Thymus in die Peripherie verlassen haben, unterstehen sie weiteren Selektionsvorgängen, da nicht alle Selbstpeptide im Thymus exprimiert werden (18). Dieser Vorgang wird als periphere Selektion oder auch periphere Toleranz bezeichnet. In der peripheren Toleranz unterscheidet man den Zustand der Anergie und der Deletion. T-Zellen gehen in den Zustand der Anergie über, wenn ihnen ein sp-MHC präsentiert wird ohne Co-Stimulation (siehe Kapitel 2.1.3.2). Diese Zellen leben zwar weiter können jedoch auch nach einem weiteren Kontakt mit sp-MHCs oder einem Fremdanitigen nicht wieder aktiviert werden. Die Deletion führt zur Apoptose von T-Zellen und tritt auf bei einem fortwährenden Kontakt mit einem sp-MHC oder einem Fremdanitigen. Die Apoptose wird eingeleitet durch den CD95-Rezeptor (siehe Kapitel 2.1.4) (19,20).

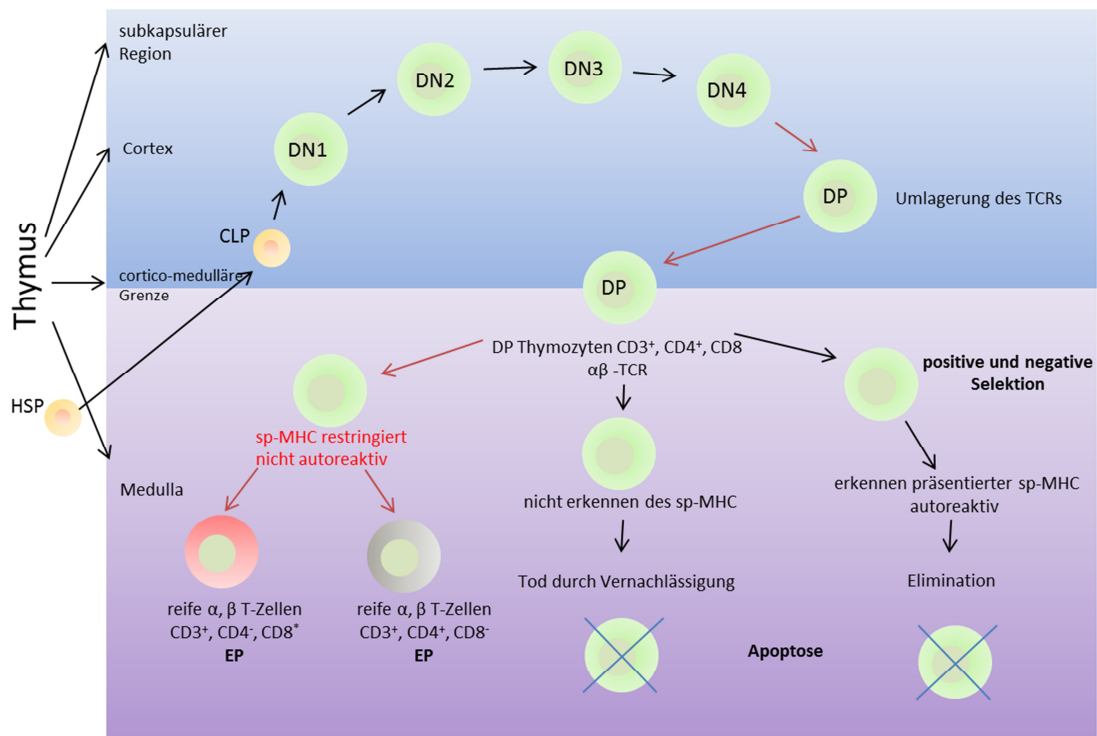


Abbildung 1 T-Zell-Entwicklung im Thymus

Die im Knochenmark entstandene CLPs wandern über den Blutweg in den Thymus ein und entwickeln sich über vier doppeltnegative ($CD4^-/CD8^-$) Thymozytenstadien (DN1-4) zu doppeltpositiven ($CD4^+/CD8^+$) Thymozyten. Die doppeltpositiven (DP) Thymozyten besitzen einen vollständig rearrangierten TCR. Bevor diese DP Thymozyten den Thymus als einfach positive T-Zellen verlassen, durchlaufen sie Selektionsprozesse, die abhängig sind von der Affinität des TCRs an sp-MHCs zu binden. Zellen, welche nicht oder nur unzureichend an sp-MHC binden, bekommen kein Überlebenssignal und gehen in Apoptose (Tod durch Vernachlässigung). Eine zu starke Affinität an sp-MHC führt ebenfalls zur Apoptose der Zelle (negativ Selektion), da diese Zellen sich zu autoreaktiven T-Zellen entwickeln könnten. Nur Zellen, die restringiert an sp-MHC binden, werden positiv selektiert und verlassen den Thymus als einfach positive CD4 oder CD8 T-Zellen. Abbildung modifiziert nach Kruse A.(21)

2.1.2 T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und ihre Untergruppen

Die im Thymus, auf MHC I und MHC II selektierten EP-Zellen, verlassen nach ihrer Entwicklung den Thymus als naive T-Zellen. Sie werden nun aufgrund ihres Phänotyps eingeteilt in CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen und zirkulieren zwischen den sekundären lymphatischen Organen auf der Suche nach Antigenen (22). Die Erkennung eines Antigens kann nur erfolgen, wenn dieses in einem MHC-

Antigenkomplex präsentiert wird. Hierbei werden zwei Klassen von MHC-Molekülen unterschieden. Das MHC Klasse I Molekül wird von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und wird von CD8⁺-Zellen erkannt. Im Gegenzug präsentierten MHC-Klasse II Moleküle Antigene, welche an CD4⁺-Zellen erkannt werden. Die Expression von MHC Klasse II findet nur auf spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APC) statt. Hierzu zählen z.B. B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (18–20) .

In Folge der Präsentation eines Fremdantigens kommt es zur klonalen Expansion der T-Zellen und zur Differenzierung in Effektor T-Zellen. Zu diesem Zeitpunkt können Effektorzellen, sowohl T-Helferzellen (Th) als auch die zytotoxischen T-Zellen (cytotoxic t-cell, CTL), in nahezu alle Gewebe migrieren. Die Migration der Effektorzellen soll sicherstellen, dass möglichst alle z.B. von Erreger infizierten Zellen vernichtet werden (21, 22) . Hierzu produzieren CTLs z.B. die zytotoxischen Proteine Granzym und Perforin, welche zum Zelltod ihrer Zielzellen führen (28). Effektor Th-Zellen hingegen produzieren Zytokine und zeigen sich als heterogene Gruppe, die aufgrund ihres Zytokinmusters unterteilt werden in Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh (follikulärer Th) und Treg (regulatorische Th-Zelle) (29,30). Durch die Freisetzung der Zytokine aktivieren die Th-Zellen weitere Immunzellen, die zur Eliminierung des Pathogens/Fremdantigens beitragen. Charakteristische für Th1 ist die Sekretion von Interferon-gamma (IFN- γ), Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF) und IL2. Sie sind beteiligt an der zellvermittelten Immunantwort und aktivieren weitere T-Zellen und Makrophagen (31,32). Th2 hingegen zeigen die Sekretion von IL4, IL5, IL9, IL10 und IL13, welche die B-Zell- und Antikörperproduktion anregen (33). Th2 nehmen somit direkten Einfluss auf die humorale Immunantwort (32). Das Zytokinmuster der Th9 wird dominiert durch die Produktion von IL9, wohingegen Th17 vor allem IL17 produzieren und Granulozyten aktivieren. Die CD25 und Forkhead box P3 (FOXP3) exprimierenden Tregs unterdrücken die Aktivierung von T-Zellen und APCs (31,34,35)

Nach vollständiger Vernichtung des Antigens gehen etwa 95% der Effektor T-Zellen in Apoptose und nur ein Teil der Zellen überlebt als T-Gedächtniszellen (36). Aufgrund der Expression von Homingmarker-Molekülen werden zwei Arten von T-Gedächtniszellen unterschieden. Zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}) sind CD62L⁺ (L-Selektin) und CCR7⁺ positiv. Sie sind in sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten und der Milz zu finden. Sie produzieren IL2 und proliferieren stetig. Effektor-T-Gedächtniszellen (T_{EM}) sind negativ für diese beiden Homingmarker-Moleküle und vor allem im peripheren nicht-lymphatischen

Gewebe anzutreffen. Sie proliferieren deutlich weniger als die T_{CM} und produzieren Effektorzytokine wie IL4 und IL5 (26,27,37).

2.1.3 T-Zell Rezeptor

2.1.3.1 Aufbau des T-Zell Rezeptors

Wie in Kapitel 2.1.1 bereits beschrieben entsteht der TCR während der T-Zell-Entwicklung im Thymus. Er besteht aus zwei Transmembranproteinen, der α - und β -Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Abbildung 2) (38). Die Spezifität des TCRs nur bestimmte, an MHC gekoppelte Antigene binden zu können, entsteht durch die sogenannte V(D)J Rekombination während der Entwicklung des TCRs. Im Zuge dieser Rekombination kommt es zum Rearrangement der TCR Genabschnitte V, D und J (39).

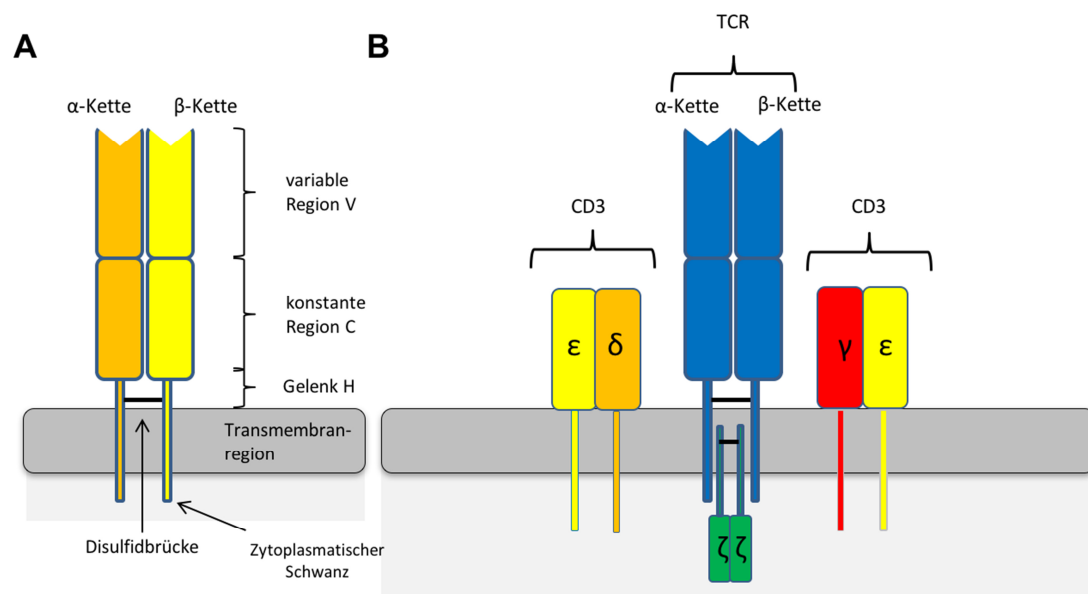


Abbildung 2 Aufbau des TCRs und des TCR-Komplexes

A. Die α - und β -Kette des TCRs bestehen jeweils aus einer konstanten Domäne C und einer variablen Domäne V. Die α - und β -Kette des TCRs ist über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. B. Der von den T-Zellen exprimierte TCR-Komplex besteht aus der α - und β -Kette des TCRs, sowie den CD3 Untereinheiten CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$ und dem intrazytoplasmatischen CD3 $\zeta\zeta$ Homodimer. Abbildungen modifiziert nach Murphy (40)

Die V(D)J-Rekombination hat das Potential über 10^{18} verschiedene TCRs beim Menschen und mehr als 10^{15} TCRs bei der Maus zu generieren (41). Nach Abschluss des Rearrangements

besteht der extrazelluläre Anteil der α - und β -Kette jeweils aus einer variablen Domäne (V) und einer konstanten Domäne (C) (Abbildung 2A). Im variablen Bereich befindet sich die Antigenbindestelle (complementarity determining regions /CDRs). Um Signale ins Zellinnere weiterleiten zu können bildet der TCR einen Komplex mit Signalproteinen. Dieser TCR-Komplex besteht somit neben der α - und β -Kette des TCRs zusätzlich aus den CD3 Untereinheiten, CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$, sowie einem intrazytoplasmatischen CD3 $\zeta\zeta$ Homodimer, welche als Signalproteine agieren (Abbildung 2B) [31, 32]. Innerhalb der zytoplasmatischen Domäne der CD3-Untereinheiten und den intrazytoplasmatischen ζ -Ketten befinden sich Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungs-Motive (ITAMs), die eine wichtige Rolle bei der Aktivierung naiver T-Zellen spielen (siehe Kapitel 2.1.3.2) (44).

2.1.3.2 Aktivierung naiver T-Zellen und intrazelluläre Signalkaskaden

Die Aktivierung naiver T-Zellen (Abbildung 3) setzt zwei Signale durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) voraus. Das erste Signal ist die Interaktion eines Antigens in Form eines MHC-Antigenkomplexes mit dem TCR. Der Co-Rezeptor, CD4 oder CD8, stabilisiert diese Interaktion, indem er an sein spezifisches MHC-Molekül bindet. Während CD4⁺ Zellen MHC-Klasse II binden, interagieren CD8⁺ Zellen mit MHC-Klasse I.

Das zweite Signal entsteht durch die Bindung des T-Zell ständigen CD28-positiven Co-Rezeptors (45). Bei den Liganden für den CD28 Co-Rezeptor handelt es sich um die Proteine CD80 oder CD86, welche von den APCs exprimiert werden (46). Fehlt eines der beiden Signale, wird die T-Zelle nicht aktiviert, sie geht in Apoptose oder in den Zustand der Anergie (41). Erhält die naive T-Zelle beide Signale, wird sie aktiviert und transkribiert Gene, welche beteiligt sind an Differenzierung, Proliferation und der Produktion von Zytokinen. Infolge der Interaktion des MHC-Antigenkomplexes mit dem TCR kommt es zur Aktivierung der Proto-Onkogen Proteintyrosinkinasen Src (Src), lymphozytenspezifische Proteintyrosinkinase (Lck) und Proto-Onkogen Proteintyrosinkinase FYN (Fyn). Diese Kinasen phosphorylieren die ITAMs in den CD3-Untereinheiten ϵ , γ , δ und ζ des TCR-Komplexes (47).

Die Phosphorylierung der ITAMs führt zur Aktivierung der T-Zell spezifischen Tyrosinkinase Zeta Kette der TCR assoziierten Proteinkinase 70kDa (ZAP-70). Die ZAP-70-Substrate, Leukozyten Protein von 76 kDa (SLP-76) und Verknüpfer zur Aktivierung von T-Zellen (LAT) sind Adaptermoleküle, die nach ihrer Phosphorylierung einen membranständigen Komplex mit weiteren Adaptermolekülen bilden.

Phospholipase- γ (PLC γ) liegt phosphoryliert in diesem Adaptermolekülkomplexe vor und führt über seine enzymatische Aktivität zur Bildung von Inositol-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) aus membrangebundenem Phosphatidylinositol-bisphosphat (PtdInsP₂) [24-25](50).

Von hier an werden drei Hauptsignalwege unterschieden. DAG aktiviert über RasGrp den Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Signalweg und über PKC θ den Protein-Kinase C- (PKC) Signalweg, während IP₃ den Calcium-Calcieneurin-Weg aktiviert (Abbildung 3)

Die MAPK-Signalkaskade verläuft über die Aktivierung von Ras, durch die Bindung von DAG an RasGrp (51). Am Ende der MAPK-Signalkaskade werden die extrazellulären signalregulierenden Kinasen (ERK) 1 und 2 aktiviert. ERK1 und ERK2 gehören zur Familie der MAPK-Kinasen und führen durch ihre Aktivität zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, bestehend aus Jun und Fos (52).

Der zweite durch TCR-Stimulierung aktivierte Signalweg, PKC-Weg oder auch NF- κ B Signalweg, bildet über die Aktivität von PKC θ einen trimolekularen Komplex, bestehend aus CARMA1, dem Adapterprotein Bcl10 und MALT1. Degradierung dieses CBM-Komplexes führt zur Aktivierung von IKK, woraufhin I κ B phosphoryliert wird (53). Die phosphorylierte Form von I κ B aktiviert NF- κ B (54,55). Die Aktivierung von NF- κ B allein über den TCR ist jedoch zu schwach für eine Translokation der Transkriptionsfaktoren von NF- κ B in den Zellkern. Das Signal muss über die Ligation des Co-Rezeptors CD28 und der dadurch entstehenden PIK3/AKT-Signalkaskade verstärkt werden (56). Die Signalkaskade verläuft über Phosphoinositid-3-Kinase (PIK3) zu PDK1 und schließlich zur Protein Kinase B (AKT) (57). AKT phosphoryliert IKK und greift somit direkt in den NF- κ B Signalweg ein. (58). Durch die Interaktion von AKT mit weiteren Zielproteinen, wie Forkhead-Box-Protein (Foxo) oder Ziel des Rapamycins im Säugetier (mTOR), regt AKT das Zellwachstum an und wirkt anti-apoptotisch [49, 50].

Der dritte Hauptweg zur Aktivierung von naiven T-Zellen, der Calcium-Calcieneurin-Weg, wird gesteuert durch die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), vermittelt durch IP₃ (61). Freigesetztes Calcium aktiviert Calcineurin, eine Calcium-Calmodulin abhängige Phosphatase, welche den Nuklearfaktor aktivierter T-Zellen (NFAT) dephosphoryliert. Daraufhin kann NFAT in den Zellkern eindringen und dort mit einer Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren interagieren (43).

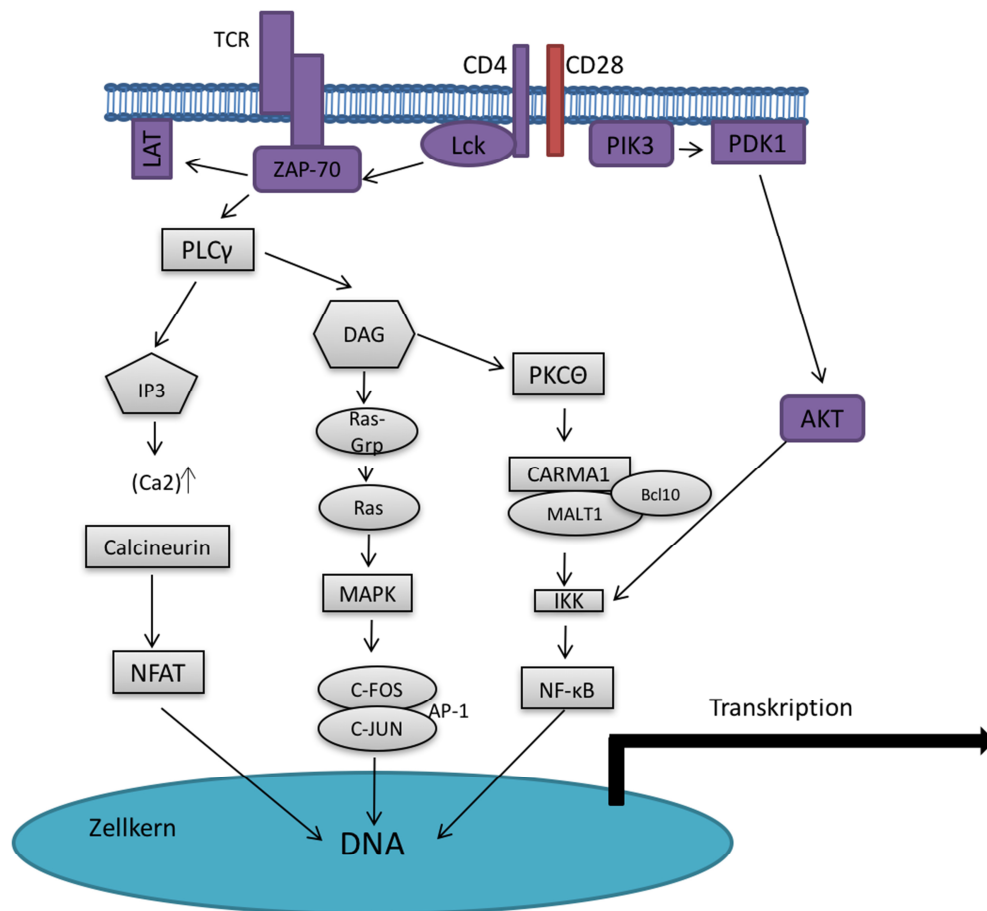


Abbildung 3 TCR-Signalwege

Die Bindung eines MHC-Antigenkomplexes an den TCR führt zur Freisetzung von Lck. Lck aktiviert die T-Zell spezifische Tyrosinkinase ZAP-70. Das ZAP-70-Substrat LAT bildet mit weiteren Adaptermolekülen einen membranständigen Molekülkomplex aus, woraufhin PLCγ aktiviert wird. Die Aktivität von PLCγ induziert die Bildung von DAG und IP₃ aus PtdInsP₂. DAG und IP₃ führen zur Aktivierung wichtiger Signalwege, wie dem MAPK-Signalweg, NF-κB-Signalweg und dem Calcium-Calcineurin-Weg. Gleichzeitig wird durch die Bindung des Co-Rezeptors CD28 die PIK3/AKT Signalkaskade aktiviert, die über die Phosphorylierung von IKK durch AKT den NF-κB-Signalweg verstärkt. Schließlich führen alle Signalkaskaden zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Nach Translokation der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern transkribieren sie Gene für Proliferation, Differenzierung und die Produktion von Zytokinen. Abbildung modifiziert nach Hayashi, et al (62)

2.1.4 T-Zell-Homöostase

Der Begriff der T-Zell-Homöostase wird sowohl im Zusammenhang des Erhalts einer konstanten T-Zell-Zahl, als auch für die Aufrechterhaltung der T-Zell-Diversität in der Peripherie verwendet (63,64). Die Homöostase ist geprägt aus einem Gleichgewicht von T-Zell-Entwicklung, -Proliferation, -Überleben, -Tod und der Differenzierung der T-Zellen (65).

Damit naive T-Zellen und Gedächtniszellen ohne Fremdantigenkontakt in der Peripherie überleben können, benötigen sie Überlebenssignale. Naive T-Zellen sind angewiesen auf die Bindung des TCRs mit sp-MHC-Komplexen und der Interaktion mit dem Zytokin Interleukin 7 (IL7). Gedächtniszellen hingegen benötigen wahrscheinlich nicht den Kontakt mit sp-MHC-Komplexen um ein Überlebenssignal zu erhalten, sind jedoch angewiesen auf die Interaktion mit Interleukin 15 (IL15) (66).

Apoptotische Mechanismen sind ein wichtiger Aspekt in der Aufrechterhaltung der T-Zell Homöostase. Nach Antigenkontakt einer naiven T-Zelle, kommt es zur massiven klonalen Expansion der aktivierten T-Zelle. Im Anschluss an die Eliminierung des Antigens geht ein Großteil der reaktiven T-Zellen in Apoptose und nur ein geringer Anteil der Zellen überlebt als Gedächtniszellen.

Die Induktion von Apoptose nach einer Immunantwort kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Ein T-Zell-spezifischer Mechanismus verläuft über den Co-Rezeptor zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4 (CTLA4), welcher von aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Er kann ebenso wie der CD28 Co-Rezeptor die Liganden CD80 und CD86 binden. Durch die Bindung der Liganden an CTLA4 kommt es zur Inhibition der Produktion von IL2 (67). Ein weiterer Rezeptor, CD95 (Fas), welcher von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, führt nach Ligation mit FasL zum aktivierungsinduzierten T-Zelltod (AICD) (68). Neben diesen rezeptorvermittelten Vorgängen entwickelt sich gegen Ende der Immunantwort ein pro-apoptotisches Milieu. Dieses entsteht durch die limitierte Bereitstellung von Zytokinen wie IL2 und einer verminderten Expression von anti-apoptotischen Genen wie B-Zell-Lymphom 2 (B-cell lymphoma 2, BCL2) (69). Mit Hilfe dieser apoptotischen Mechanismen wird in Folge einer Immunantwort sichergestellt, dass sowohl die T-Zell-Zahl als auch die Diversität der T-Zellen aufrechterhalten wird und die Immunantwort beendet wird.

2.1.4.1 Klonales Konkurrenz-Modell

Naive T-Zellen sind in der Peripherie auf Überlebenssignale in Form von Zytokinen und sp-MHC-Komplexen angewiesen (siehe Kapitel 1.2.3.). Die Bindung der T-Zellen mit dem sp-

MHC-Komplexen verläuft TCR abhängig. Aufgrund dieser TCR-Abhängigkeit binden die verschiedenen T-Zell-Klone an unterschiedliche sp-MHC-Komplexe. Sie besetzen verschiedene „stimulatorische Nischen“. Diese stimulatorischen Nischen stellen eine limitierende Ressource dar, die sicherstellt, dass zum einen die Zellzahl und zum anderen die Diversität des T-Zell Repertoires aufrechterhalten werden. Dadurch stehen T-Zellen in einem ständigen Konkurrenzkampf um stimulatorische Nischen (66). Man unterscheidet einen interklonalen- und einen intraklonalen Konkurrenzkampf um diese Nischen (Abbildung 4).

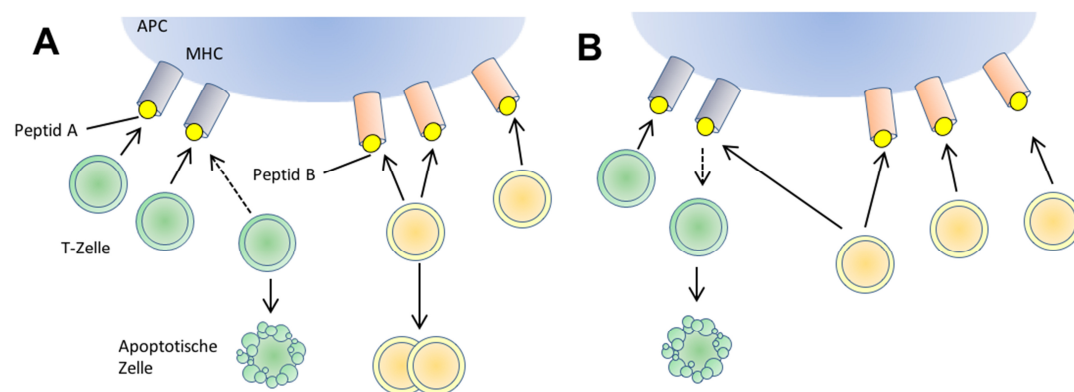


Abbildung 4 Klonales Konkurrenz-Modell

A. Intraklonale Konkurrenz – Die beiden dargestellten T-Zellpopulationen (gelb und grün) sind spezifisch für unterschiedliche sp-MHC Komplexe. Der Konkurrenzkampf um stimulatorische Nischen (sp-MHC) findet somit ausschließlich innerhalb der jeweiligen Population (intraklonal) statt. B. Interklonale Konkurrenz - Aufgrund von Promiskuität des TCRs innerhalb einer T-Zellpopulation (gelbe T-Zellen) ist es den T-Zellen möglich, nicht nur ihre „eigene“ stimulatorische Nische zu besetzen. Sie konkurrieren ebenfalls um die spezifischen Nischen anderer T-Zellpopulationen (grüne T-Zellen). Abbildung modifiziert nach Takada, et al (70)

Die intraklonale Konkurrenz beschreibt die Konkurrenz von T-Zellen eines TCR-Klons untereinander um ihre stimulatorische Nische. So zeigte sich in transgenen Mausmodellen, dass monoklonale TCR transgene T-Zellen wie OT1- oder P14- Zellen nach Transplantation in transgene Mäuse vom selbigen T-Zell-Typ nicht proliferieren. Ihre stimulatorischen Nischen sind bereits besetzt, sie bekommen kein Überlebenssignal. Nach Transplantation von P14-Zellen in OT1-transgene Mäuse oder OT1-Zellen in P14-transgene Mäuse hingegen kommt es zur Proliferation der transplantierten T-Zellen (71).

Die interklonale Konkurrenz beschreibt den Wettbewerb zwischen T-Zellen mit unterschiedlichem TCR um stimulatorische Nischen. So können verschiedene T-Zell Klone aufgrund von Promiskuität und Affinität ihres TCRs um eine unterschiedliche Vielfalt von sp-MHC (Nischen) konkurrieren. In Mausmodellen, in welchen die Konkurrenz zwischen verschiedenen monoklonalen TCR transgenen T-Zellen untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass aufgrund von T-Zell-Promiskuität und Affinität eine Wettbewerbshierarchie entsteht (72,73). Demnach haben T-Zellen mit einer geringeren Affinität einen Selektionsvorteil gegenüber T-Zellen mit einer starken Affinität, da sie mehr stimulatorische Nischen nutzen können (74).

2.1.4.2 Die Rolle des klonalen Konkurrenz-Modells in der Lymphomagenese

Das beschriebene klonale Konkurrenz-Modell (siehe Kapitel 1.2.3.1) stabilisiert nicht nur das normale T-Zell-Repertoire, es könnte auch eine wichtige Rolle in der Unterdrückung der T-Zell-Lymphomagenese spielen. Murine TCR polyklonale T-Zellen zeigen nach Transduktion mit bekannten potenten T-Zell-Onkogenen und anschließender Transplantation in lymphopenische Mäuse keine Transformation (1). Im gleichen Versuchsaufbau mit monoklonalen TCR transgenen T-Zellen kommt es zur Transformation und der Entwicklung maligner Lymphome nach charakteristischen Latenzperioden. Die T-Zellen stehen in keiner interklonalen Konkurrenz. Sie können ungehindert ihre stimulatorische Nische besetzen und proliferieren. Die Hypothese, dass polyklonale T-Zellen die Entstehung von Lymphomen aufgrund von klonaler Konkurrenz unterdrücken können, korreliert ebenfalls mit den Beobachtungen nach Co-Transplantation von polyklonalen T-Zellen in lymphopenische Mäuse, welche mit Onkogen-transduzierten monoklonalen TCR transgenen T-Zellen transplantiert wurden (2). So kommt es hierbei, vermutlich aufgrund des klonalen Konkurrenzkampfs, zu keiner Entstehung von Lymphomen.

2.2 Periphere T-Zell Lymphome

Periphere T-Zell Lymphome (PTCL) sind eine seltene und heterogene Form der Non-Hodgkin Lymphome beim Menschen. Sie umfassen alle malignen Entartungen reifer T-Zellen und natürlicher Killerzellen (NK). Weltweit machen sie einen Anteil von weniger als 15% der Non-Hodgkin Lymphome (NHL) aus und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (75). Nach der Klassifizierung der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) werden die PTCL in vier große Gruppen eingeteilt. Die Einteilung erfolgt auf Grund klinischer Merkmale in die nodale,

extranodale, kutane und leukämische Gruppe (76). Zur nodalen Gruppe zählt das anaplastische, großzellige Lymphom (ALCL), welches weiter unterteilt wird in das ALK-positive (ALK⁺) ALCL und das ALK-negative (ALK⁻) ALCL (77).

2.2.1 Das ALK positive anaplastische großzellige Lymphom (ALK⁺ ALCL)

Das ALK⁺ ALCL wurde erstmals im Jahr 1985 beschrieben (78). Es ist ein peripheres T-Zell-Lymphom, das vor allem im Kindes- und Jugendalter auftritt. Es macht in dieser Altersgruppe 15-20% der Non-Hodgkin-Lymphome aus, wobei der Anteil im Erwachsenenalter nur bei etwa 2% liegt (79). Bei Diagnosestellung befinden sich 70-80% der Patienten bereits im Stadium III-IV der Erkrankung und zeigen Begleitsymptome wie Nachtschweiß, Fieber und unerklärlichen Gewichtsverlust. Eine multiple extranodale Beteiligung von Organen ist in etwa 60% der Fälle zu beobachten. Am häufigsten sind Haut, Knochen, Lunge, Leber und subkutanes Gewebe betroffen. Das Knochenmark, sowie das zentrale Nervensystem und der Gastrointestinaltrakt sind nur selten involviert (80–83).

Charakteristisch für die Zellen des ALK⁺ALCLs ist eine starke Expression des Oberflächenmarkers CD30 auf der Zellmembran und in der Nähe des Golgi Apparats, sowie die Expression von ALK (76,84). ALK liegt in etwa 80% der ALK⁺ALCL Fälle als Fusionsprotein mit Nucleophosmin vor und ist zurückzuführen auf eine Chromosomentranslokation (2;5)(p23;35) (85,86). Neben der Expression des Oberflächenmarkers CD30 sind die Zellen ebenfalls gekennzeichnet durch eine Expression des Co-Rezeptors ICOS (87). Den neoplastischen Zellen des ALK⁺ALCL ist kein einheitlicher Immunophänotyp zuzuordnen und sehr oft geht er mit einem vollständigen Verlust von T-Zellmarkern einher (88). Die allgemeinen T-Zellmarker CD3 und TCR sind in den meisten ALK⁺ALCL Fällen nicht nachweisbar (89). Die Tumorzellen sind zudem meist CD5, CD7 negativ und CD2 positiv. Der häufigste Phänotyp ist CD4⁺/CD8⁻, äußerst selten kommt der Phänotyp CD4⁻/CD8⁺ vor (90–92). Die sicherste Form der Diagnosestellung erfolgt aufgrund des Nachweises von ALK und CD30 in der Immunhistochemie in Zusammenhang mit der Klinik (93). In der histologisch häufigsten Variante des ALK⁺ALCLs zeigen sich die Zellen anaplastisch, groß und unregelmäßig geformt mit multiplen Nuclei. Das meist basophile Zytoplasma macht einen großen Teil der Zelle aus. Die neoplastischen Zellen wachsen invasiv und befinden sich häufig im Bereich der Lymphknotensinus. Kennzeichnend sind die sogenannten „Hallmark-Zellen“, welche in allen Varianten des ALCLs zu finden sind. Hallmark-Zellen haben einen großen, exzentrisch gelegenen Zellkern in Hufeisen- oder Nierenform [67, 71, 72, 82].

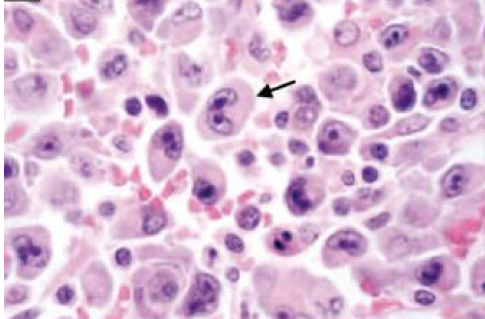


Abbildung 5 Histologie des ALK⁺ ALCLs

Morphologie des ALK⁺ALCLs in einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung bei 800x Vergrößerung. Der Pfeil zeigt auf eine für das ALCL charakteristische Hallmark-Zelle. Hallmark-Zellen besitzen einen großen, exzentrisch gelegenen Zellkern in Nierenform. Sie sind in allen Varianten des ALCLs zu finden.

Abbildung übernommen aus Falini, et al (95)

2.2.2 Anaplastische Lymphomkinase

ALK ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase und gehört zur Superfamilie der Insulin-Rezeptoren. Nachdem eine wiederkehrende Chromosomentranslokation, Chromosom 2 und 5 betreffend, im ALCL beobachtet werden konnte, wurde ALK erstmals als Ergebnis der Klonierung des Fusionsgens NPM-ALK identifiziert [84–86]. Seitdem konnte eine Vielzahl von weiteren ALK-Fusionspartnern identifiziert werden. Allerdings resultiert in 80% der ALK⁺ ALCLs Fälle die Überexpression von ALK aus der Translokation von NPM-ALK (2;5)(p23;35) (86). Physiologisch kommt ALK nur sehr restriktiv in wenigen Zellen des Nervensystems vor (99). Neben der Expression von ALK im ALCL konnte in vielen weiteren Tumorarten, wie Brustkrebs, Colorektalkrebs, dem Neuroblastom, in inflammatorischen myofibroblastischen Tumoren, dem diffusen B-Zell-Lymphom, in Ösophaguskrebs und Lungenkrebs, die Expression von ALK nachgewiesen werden [89–94].

2.2.2.1 NPM-ALK vermittelte Signalwege im ALCL

In ALK⁺ALCL-Zellen wird die Expression von NPM-ALK durch den Promoter von Nucleophosmin (NPM) angetrieben. Dies führt dazu, dass die Tyrosin-Kinase (TK)-Domäne von ALK kontinuierlich aktiviert ist. Durch Interaktion von ALK, mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen, werden diverse Signalwege aktiviert.

Ein wichtiger Interaktionspartner von NPM-ALK ist der Signaltransduktor und Aktivator von Transkription 3 (STAT3). Die Aktivierung des STAT3-Signalwegs erfolgt durch direkte Phosphorylierung von STAT3 durch NPM-ALK sowie die Interaktion von NPM-ALK mit der Januskinase 3 (JAK3), ein physiologischer Aktivator von STAT3 (106). Die aktive Form,

phospho-STAT3 (pSTAT3), dringt in den Zellkern ein und führt zu einer gesteigerten Transkription von antiapoptotischen- und zellwachstumsfördernden Genen, wie BCL2, BCL2-Like-1 (B-cell lymphoma 2-Like-1, BCL2L1), CCAAT/Enhancer und Bindungsprotein beta (CCAAT/Enhancer binding protein beta, CEBPB), induziertes myeloid Leukämie-Zell-Differenzierungsprotein 1 (induced myeloid leukemia cell differentiation protein, MCL1) und verschiedener Cycline (80). Ebenfalls aktiviert pSTAT3 die Transkription der Gene des Co-Rezeptors ICOS und unterdrückt die Expression des ICOS –Inhibitors miR-219 (87).

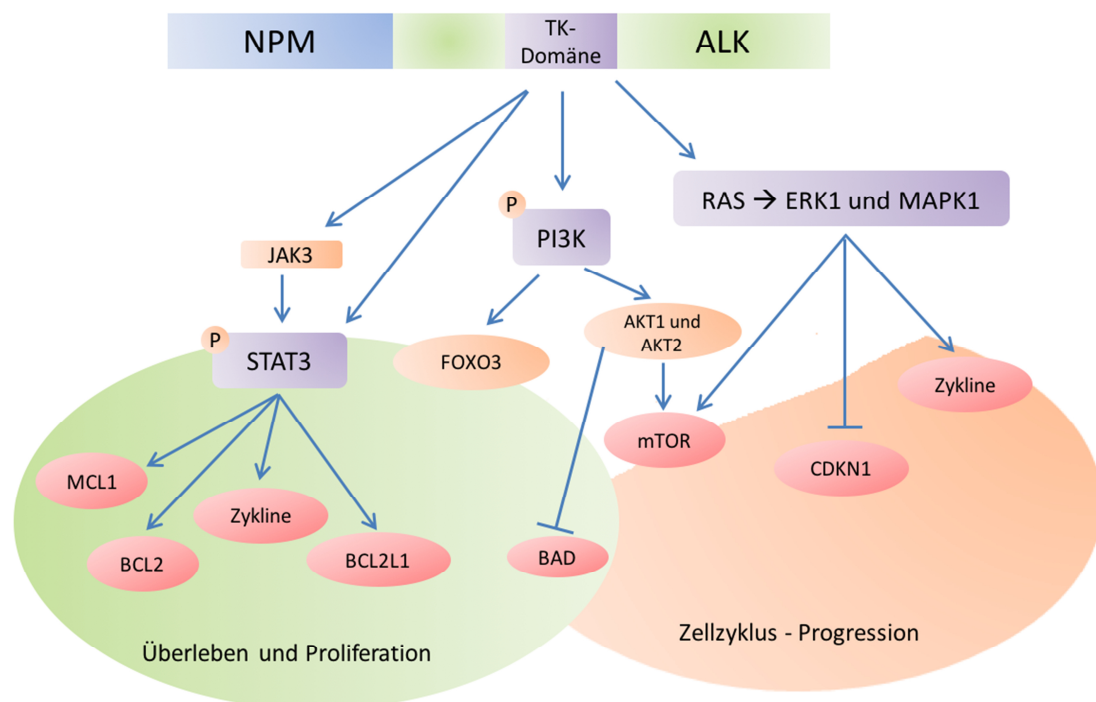


Abbildung 6 NPM-ALK Signalwege

Über die Aktivität der TK-Domäne von NPM-ALK werden verschiedene Signalwege wie der STAT3-Signalweg, der PI3K/AKT-Signalweg und der MAPK-Signalweg aktiviert. Die am Ende dieser Signalkaskaden aktivierten oder inhibierten Proteine wirken sich auf die Zellproliferation, den Zellzyklus und das Überleben der Zellen aus. Abbildung modifiziert nach Boi., et al (80)

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Aktivität von STAT3 im ALK⁺ALCL signifikant zur Pathogenese dieser Lymphomart beiträgt (107–110). Die Blockade des STAT3-Signalwegs führt sowohl in-vitro als auch in-vivo zur Unterdrückung der Tumorgenese (111). Die Detektion von pSTAT3 im Zellkern gilt ebenfalls als Marker des ALK⁺ALCL.

Der PIK3/AKT-Signalweg, welcher bereits als wichtiger Signalweg der T-Zell Aktivierung in Kapitel 2.1.3.2 beschrieben wurde, wird durch Interaktion von NPM-ALK mit der regulatorischen Untereinheit p85 von PIK3 aktiviert. Die PIK3/AKT-Signalkaskade führt über die Blockierung des proapoptotischen Proteins BCL2 assoziierter Antagonist für Zelltod (BCL2 associated agonist of cell death, BAD) zu einem gesteigerten Überleben und durch die Phosphorylierung von FOXO3 durch AKT zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen (112)(113).

Ein dritter wichtiger Signalweg, induziert durch NPM-ALK, ist der MAPK-Signalweg, welcher ebenfalls bereits in Kapitel 2.1.3.2 beschrieben wurde. Aufgrund der Runterregulierung von CDKN1A (p21) und der Aktivierung von Cyclinen durch pERK kommt es zu einem unkontrollierten, gesteigerten Zellzyklus und zur Zellproliferation.

Sowohl der PIK3/AKT-Signalweg als auch der MAPK-Signalweg aktivieren mTOR (114,115). Die aktive Form von mTOR aktiviert den Transkriptionsfaktor JunB, der zur Familie der AP1-Transkriptionsfaktoren gehört. JunB fördert die Transkription des CD30-Rezeptors, welcher charakteristisch für das ALK⁺ALCL ist. Die Signalkaskade des CD30-Rezeptors wiederum verläuft über die MAPK-ERK-JunB Kaskade und unterstützt somit seine eigene Expression (114–116).

Zusammenfassend zeigt sich die onkogene Wirkung von NPM-ALK aufgrund der beschriebenen Signalkaskaden. So führt die Aktivierung der verschiedenen Signalwege zu einer gesteigerten Zellproliferation, verlängertem Überleben der Zelle, Umgestaltung des Zytoskeletts, Apoptoseinhibition und Zellmigration.

2.2.3 Murine Modelle des ALK⁺ ALCLs

Mausmodelle werden häufig genutzt, um die Pathophysiologie der humanen Lymphomagenese genauer zu untersuchen. Da das am häufigsten vorkommende Fusionsonkogen im ALK⁺ ALCL NPM-ALK ist, wurde NPM-ALK eingesetzt, um transgene Mäuse zu entwickeln (86). Transgene Mäuse, welche NPM-ALK angetrieben durch einen CD4-Promotor exprimieren, erkrankten im Alter von 17 bis 18 Wochen an Tumoren. Die entnommenen Tumoren zeigen keinen einheitlichen ALK⁺ ALCL Phänotyp. Während in Linie N1 der transgenen Tiere über 80% der analysierten Tumoren den Phänotyp eines Plasmozytoms zeigen, wurden in Linie N16 90% der Tumoren einem CD30⁺ T-Zell Phänotypen zugeordnet (117). Auch die Entwicklung von NPM-ALK transgenen Mäusen, mit

einem Vav-Guaninnukleotidaustauschfaktor (Vav)- oder Lck-Promotor, zeigt das deutliche onkogene Potential von ALK durch Ausbildung von diffusen B-Zell-Lymphomen. Auch in diesen transgenen Tieren zeigen die Tumoren keinen typischen ALK⁺ ALCL Phänotypen (118,119).

Neben den genannten genetisch veränderten Mausmodellen stellen Transplantationsmodelle eine gute Alternative dar. Eine Methode ist die Transplantation muriner Zelllinien. Die murine anaplastische lymphoide T-Zelllinie (TS1G6) dient als Transplantationsmodell für das ALCL. Zur Entwicklung dieser T-Zelllinie wurde ein CD3⁺, CD4⁺ T-Zell Klon aus einer C57BL/6 Maus isoliert und mit Interleukin 9 (IL9) transfiziert. Das syngene Transplantationsmodell mit der TS1G6-Zelllinie führt sowohl in immundefizienten Mäusen als auch in immunkompetenten C57BL/6 Mäusen zur Ausbildung von ALCL-ähnlichen Tumoren (120,121). Eine weitere Möglichkeit ist das Einbringen des Onkogens NPM-ALK in primäre murine Stammzellen (HSC) aus dem Knochenmark. Nach erfolgreicher retroviraler Transduktion der HSCs mit NPM-ALK ex vivo werden die transduzierten HSCs in letal bestrahlte Mäuse mittels intravenöser (i.v.) Injektion in die Schwanzvene transplantiert. In der ersten Studie, in der dieses Modell beschrieben wurde, erkrankten die transplantierten Mäuse nach einer Latenzperiode von 4-6 Monaten an Tumoren. Die Tumoren entwickelten sich in den mesenterialen Lymphknoten, der Lunge, den Nieren, der Leber, der Milz und im paraspinalen Bereich. Bei der Analyse der Tumore zeigt sich, dass die Transformation in der B-Zelllinie stattgefunden hat (122). In einer weiteren Studie, mit gleichem Transplantationsmodell, zeigt sich bei unterschiedlicher Multiplizität der Infektion (MOI) auch ein unterschiedlicher Phänotyp der entstehenden NPM-ALK induzierten Tumoren. HSCs, transduziert mit einer niedrigen MOI, bilden in Mäusen nach einer Latenzperiode von 12 bis 16 Wochen Plasmazytome aus. Hingegen entwickelten Mäuse, welchen HSCs transduziert mit einer hohen MOI transplantiert werden, nach einer kürzeren Latenzzeit von 3 bis 4 Wochen histiozytenreiche Lymphome aus (123).

Ein weiterer Ansatz für ein ALK⁺ ALCL-Mausmodell baut auf der Kombination von IL9-transgenen Mäusen und der Transplantation von NPM-ALK transduzierten HSCs auf. IL9-transgene Mäuse wurden in dieser Studie ausgewählt, da sie spontan die Entstehung von Thymus-Lymphomen zeigen (124). Werden HSCs aus IL9-transgenen Mäusen isoliert und nach retroviralem Gentransfer mit NPM-ALK in IL9-transgene Mäuse transplantiert, entstehen in den Mäusen nach einer Latenzzeit von 13 bis 30 Wochen Plasmazytome,

lymphoblastische T-Zell Lymphome und B-Zell Lymphome. Tumoren mit einem ALK⁺ ALCL Phänotyp konnten nicht ermittelt werden (125).

Werden anstelle von HSCs, murine polyklonale T-Zellen, isoliert aus C57BL/6 Mäusen, mit NPM-ALK transduziert und in Rag1-defiziente Mäuse transplantiert, kommt es zu keiner Transformation in den Empfängertieren (1). Die Transduktion von NPM-ALK in TCR transgene monoklonale T-Zellen, wie OT1- oder P14- Zellen, mit anschließender Transplantation in Rag1-defiziente Mäuse führte zur Ausbildung von T-Zell-Lymphomen. Die Latenzperiode beträgt 30 bis 80 Tage. Alle transplantierten Mäuse zeigen vergrößerte Lymphknoten und eine Splenomegalie. Die Analyse der Tumoren zeigt einen ALK⁺ ALCL ähnlichen Phänotypen (2).

2.3 Lymphome in der Veterinärmedizin

Die Ätiologie von Lymphomen der Haussäugetiere ist sehr vielfältig. Eine virale Ätiologie wurde bereits im Jahr 1871 erstmals beschrieben. Hierbei handelt es sich um die bovine Leukose, welche zurückzuführen ist auf das bovine Leukämievirus (BLV). Das BLV führt durch die Akkumulation von transformierten B-Zellen zur Tumorbildung (126). Vereinzelt bedingt das BLV ebenfalls eine Tumorausbildung bei Schafen (127). Weitere viral bedingte Entstehungen von Lymphomen sind beschrieben bei Katzen (felines Leukämievirus; FeLV), Hühnern (aviäres Leukämievirus; ALV) und Mäusen (murines Leukämievirus; MLV) (128–131). Für den Hund konnte bisher keine virale Ätiologie im Zusammenhang mit der Entstehung von NHL beobachtet werden (132). Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin stehen immer wieder Chemikalien in Verdacht eine kanzerogene Wirkung zu haben. In zwei Studien zeigten Hayes et. al. den Zusammenhang zwischen der Exposition mit dem Pestizid 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure und der Entstehung von NHL (133,134). In in-vivo- und in-vitro-Studien konnte bisher jedoch das kanzerogen Potential von 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure nicht abschließend nachgewiesen werden (135). Beim Menschen werden häufig im Zusammenhang mit dem NHL chromosomale Anomalien festgestellt. In der Veterinärmedizin konnten bei an Lymphomen erkrankten Hunden Trisomien der Chromosomen 13, 34 und 36 nachgewiesen werden (136). In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2003 von Thomas et al. wurden 25 canine Lymphome auf chromosomale Anomalien untersucht. Hier zeigte sich am häufigsten der Zugewinn des Chromosoms 13 gefolgt von Chromosom 31. Ein Verlust von Chromosomen trat am häufigsten Chromosom 14 und 11

betreffend auf (137). Insbesondere zum Lymphom des Hundes gibt es zahlreiche epidemiologische Untersuchungen, welche eine deutliche Rassedisposition zeigen. In diesen Studien werden unter anderem Boxer, Bullmastiffs, Bulldogen, American Staffordshire Terrier, American Pitbull Terrier, Rottweiler, Golden Retriever, Irish Setter, aber auch im allgemeinen mittlere- bis mittelgroße Hunde als prädisponiert beschrieben (138–143). In einer epidemiologischen Studie, in welcher die Rassedisposition beim Hund in Deutschland untersucht wurde, zeigt sich ebenfalls beim Bullmastiff, dem American Staffordshire Terrier, dem American Pitbull Terrier sowie den Irish Setter eine signifikante Prädisposition für die Entstehung von Lymphomen. Interessanterweise konnte in dieser Studie keine erhöhte Prävalenz für das Auftreten von Lymphomen beim Boxer und Golden Retriever festgestellt werden (144). Eine statistisch signifikante Geschlechtsdisposition konnte beim Hund bisher nicht verzeichnet werden (141,144). Die jährliche Inzidenz des Lymphoms liegt beim Hund bei 13 bis 33 Neuerkrankungen pro 100000 Patienten und einem Durchschnittsalter von 8,1 (Median) Jahren (144,145). Nach Schneider et al. liegt die Inzidenz des Lymphoms bei Katzen sechsmal höher als beim Hund und somit bei 160 Neuerkrankungen pro 100000 Patienten jährlich (146). Eine deutliche Geschlechtsdisposition ist bei der Katze zu verzeichnen, so haben unkastrierte Kater ein dreifach höheres Risiko an einem Lymphom zu erkranken als kastrierte Kätzinnen (146).

Wie in Kapitel 2.2 beschrieben werden NHLs in der Humanmedizin nach den Empfehlungen der WHO klassifiziert. In Anlehnung an die humanmedizinische Klassifizierung wurde im Jahr 2002 von der WHO die „Revised European-American-Lymphoma classification of domestic animals“ (REAL) herausgegeben (147). Grundlegend für die Klassifizierung ist eine Unterteilung in B- und T-Zelllymphome aufgrund des Zellphänotyps und die Einbeziehung der Tumorlokalisation (147). Seit der Herausgabe der REAL-Klassifizierung wurde diese regelmäßig überarbeitet und angepasst. Da das Lymphom bei Hunden und Katzen die am häufigsten auftretenden hämatopoetische Neoplasie ist, wurde die REAL-Klassifizierung seitdem insbesondere bei diesen beiden Haussäugetierarten angewendet (147–150).

Bei genauerer Betrachtung der Lymphome treten beim Hund deutlich häufiger B-Zell-Lymphome als T-Zell-Lymphome auf (148,151). Jedoch kommt es zu rassespezifischen Unterschieden. So sind ca. 80% aller Lymphome des Boxers einem T-Zellphänotyp zuzuordnen (152,153). Bei der Katze verhält es sich konträr, hier werden deutlich häufiger T-Zell-Lymphome beobachtet als B-Zell-Lymphome (148,154). Neben der Unterscheidung in

B-Zell- und T-Zell-Lymphom werden die Tumore weiter klassifiziert in ihre Subtypen. Für das B-Zell-Lymphom tritt sowohl bei Hunden als auch bei Katzen das großzellige B-Zell-Lymphom (large B-cell lymphoma; B-LCL) am häufigsten auf (148,149,154). Das beim Hund am häufigsten auftretende T-Zell Lymphom ist das lymphoblastische T-Zell Lymphom (T-LBL) (148). Bei der Katze treten innerhalb der T-Zell Lymphome vornehmlich periphere T-Zell Lymphome auf (154). Das ALCL, welches zu den PTCL gehört, wurde bereits bei Hunden und Katzen im Rahmen der Subklassifizierung beschrieben (148,149,154). Hierbei handelt es sich um Lymphome, welche aufgrund ihres Phänotyps, ihrer Morphologie und ihrer topographischen Lage starke Ähnlichkeiten mit dem humanen ALCL aufweisen, welche jedoch bisher nicht weiter charakterisiert wurden auf die in der humanen Variante typische Expression von ALK und CD30 (149).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Tabelle 1 Antikörper

Antikörper	Klon	Konjugat	Hersteller	Anwendung
Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP			Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark	WB
Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP			Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark	WB
CD3	145-2C11	APC	Biolegend San Diego, Kalifornien, USA	FC
CD3	145-2C11	PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	FC
CD4	GK1.5	APC	Biolegend San Diego, Kalifornien, USA	FC
CD4	GK1.5	APC-Cy7	Biolegend San Diego, Kalifornien, USA	FC
CD8	53-6.7	VioBlue	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	FC
CD19	6D5	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	FC
CD19	1D3	PE-Cy7	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA	FC
CD25	PC61	PerCp	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	FC
CD28	37.51	APC	Biolegend San Diego, Kalifornien, USA	FC

Antikörper	Klon	Konjugat	Hersteller	Anwendung
CD30	mCD30.1	PE	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA	FC
CD38	90	PE-Cy7	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA	FC
CD44	IM7.8.1	VioBlue	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	FC
CD69	H1.2F3	PE-Cy7	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	FC
GFP			Abcam, Cambridge, UK	WB
ICOS	7E.17G9	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland I	FC
NPM-ALK	ALK1	PE	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	FC
NPM-ALK	ALK1	FITC	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	FC
NPM-ALK			Abcam, Cambridge, UK	WB
PD1		VioBlue		FC
Phospho- AKT (T308)	J1-223.371	PE	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	IZFC
Phospho-ERK1/2 (pT202/pY204)	20A	PE	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	IZFC
Phospho-STAT1 (pY701)	4a	PE	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	IZFC
Phospho- STAT3(pY707)	4/P-STAT3	PE	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	IZFC
Phospho-STAT5 (pY694)	47	PE	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	IZFC
TCR α/β	H57-597	APC	Life Technologies, Darmstad, Deutschland	FC

Antikörper	Klon	Konjugat	Hersteller	Anwendung
Vα2 TCR	B20.1	APC	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA	FC
Vβ5 TCR	MR9-4	PE	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	FC
Vβ8 TCR	MR5-2	PE	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	FC
CD246 (ALK)	ALK1		DAKO	IHC
FC: Durchflusszytometrie; IHC: Immunhistochemie; IZFC: Intrazelluläre Durchflusszytometrie; WB: Western Blot				

3.1.2 Verwendete Bakterien

Der Escherichia coli Stamm „One Shot TOP10“ (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) wurde für die sogenannte Bakterientransformation eingesetzt (siehe Kapitel 3.6.2)

Genotyp: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

Der Genotyp-Schlüssel ist im Anhang in Tabelle 17 hinterlegt.

3.1.3 Zelllinien und primäre Zellen

Tabelle 2 Zelllinien und primäre Zellen

Zellen	Medium	Beschreibung
293T	DMEM complete	Zelllinie aus humanen, embryonalen Nierenepithelzellen, enthalten das SV40 T-Antigen (155)
SC1	DMEM complete	Zelllinie aus murinen, embryonalen Fibroblasten (156)
CTLL2	IMDM-CTLL2	Zelllinie aus murinen, zytotoxischen T-Zellen (157)
Murine Splenozyten	RPMI 1640 mouse special	Isoliert aus Milz und Lnn. von OT-1 und P14-Mäusen

3.1.4 Verwendete Plasmide und Vektoren

Tabelle 3 Plasmide und Vektoren

Plasmide	Beschreibung	Herkunft
M187	Expressionsplasmid für das ecotrophe Hüllprotein aus MLV	Stitz J., et al (158)
M387	Retroviraler Vektor, kodiert für IRES-GFP	Schambach A., et al (159)
M579	Expressionsplasmid für MLV Gag-Pol mit SV40-Promotor	C. Baum (Medizinische Hochschule Hannover)
P3	Retroviraler Vektor, kodiert für NPM/ALK-IRES-GFP	Newrzela S., et al (2)
P52	Retroviraler Vektor, kodiert für NPM/ALK - IRES-Luciferase	K. Cornils (Universität Hamburg)
P53	Retroviraler Vektor, kodiert für T-Sapphire-IRES-Luciferase	K. Cornils (Universität Hamburg)

3.1.5 Mausstämme

Tabelle 4 Mausstämme

Name/Referenz	geläufiger Name	Produzent
B6.129S7-Rag-1tm1Mom/J	Rag1-	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA
C57BL/6Tg (TcraTcrb) 1100Mjb/j	OT1	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA
B6;D2-Tg (TcrLCMV)327Sdz/JDvsJ	P14	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA

3.2 Versuchsplanung

Sowohl für die in-vitro-Versuche mit der zytotoxischen T-Zelllinie CTLL2 als auch für die In-vivo-Mausexperimente wurden aus den bereits klonierten Vektoren und Plasmiden (GFP; GFP gekoppelt an NPM-ALK; GFP gekoppelt an T-Sapphire; NPM-ALK gekoppelt an T-

Sapphire) (Tabelle 3) ecotrope Vektorüberstände hergestellt (siehe Kapitel 3.7.8). Die Teilschritte bis zur Herstellung dieser ecotropen Vektorüberstände sind schematisch in Abbildung 7 dargestellt. Die hierfür verwendeten Methoden sind in den Kapiteln 3.5.2, 3.6.3, 3.7.8 und 3.7.9 genauer beschrieben.

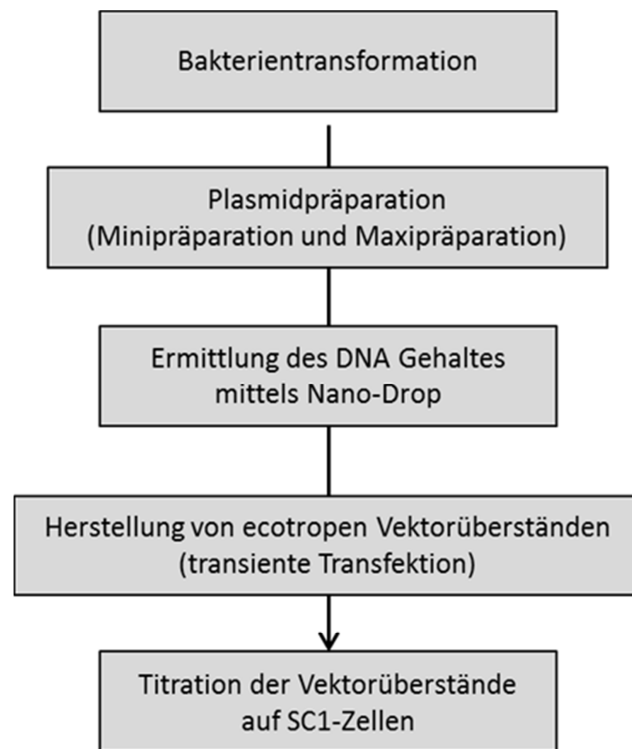


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Teilschritte bis zur Herstellung von ecotropen Vektorüberständen

3.3 Versuchsplanung der in-vitro CTLL2-Versuche

Die murine zytotoxische T-Zelllinie CTLL2 wurde mit dem Onkogenvektor (Tabelle 3) NPM-ALK gekoppelt an GFP oder mit dem Kontrollvektor GFP transduziert (siehe Kapitel 3.7.11). Die transduzierten Zellen wurden über drei Monate in Kultur gehalten und bei jeder Passagierung (siehe Kapitel 3.7.3) die Expression von GFP mittels FACS-Analyse ermittelt (siehe Kapitel 3.8). Nach drei Monaten wurden die CTLL2-Langzeitkulturen auf die GFP-positive Zellpopulation sortiert (siehe Kapitel 3.8.7).

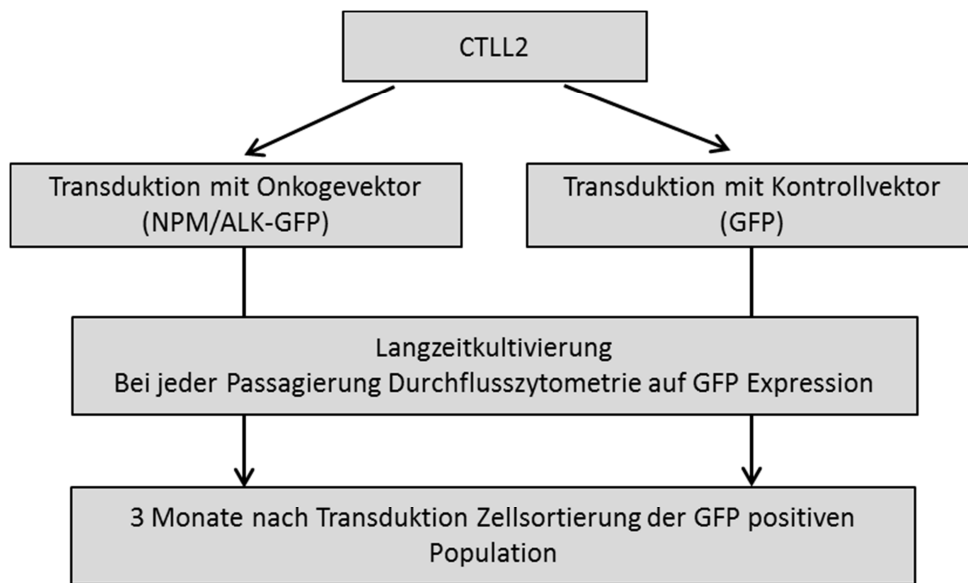


Abbildung 8 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für transduzierte CTLL2-Langzeitkulturen

Im Anschluss wurden die sortierten GFP-positiven Zellpopulationen aus den CTLL2-Langzeitkulturen hinsichtlich ihres Phänotyps (siehe Kapitel 3.8.3) und auf den Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Signalproteine (siehe Kapitel 3.8.6) in der FACS-Analyse untersucht. Die Proteinexpression von GFP und NPM-ALK wurde zusätzlich mittels Western Blot (siehe Kapitel 3.6.5) ermittelt.

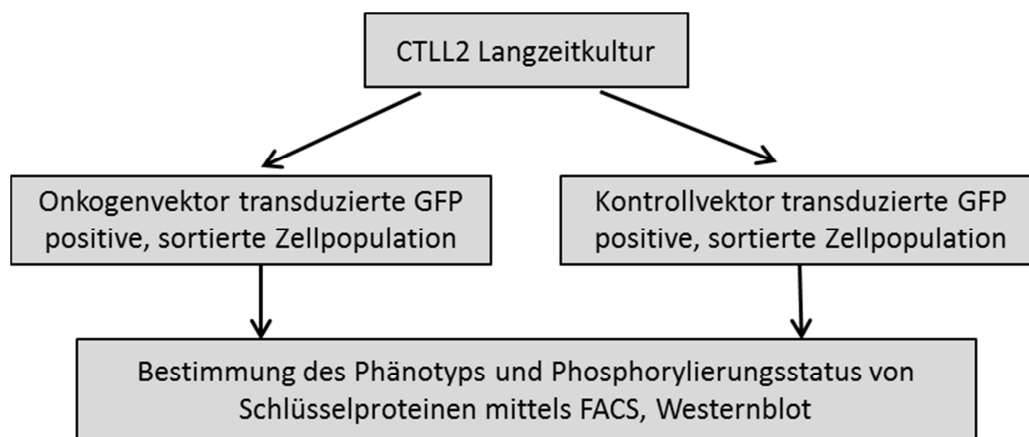


Abbildung 9 Schematische Darstellung der weiterführenden Untersuchungen der transduzierten CTLL2-Langzeitkulturen

In einem weiteren Versuch wurden CTLL2 ebenfalls mit dem Onkogenvektor NPM-ALK gekoppelt an GFP oder dem Kontrollvektor GFP transduziert. Bereits 24 Stunden nach Transduktion und für die darauffolgenden Tage wurde ein Apoptose Assay (siehe Kapitel 3.8.5) der Onkogen- und Kontrollgen-transduzierten CTLL2 erstellt.

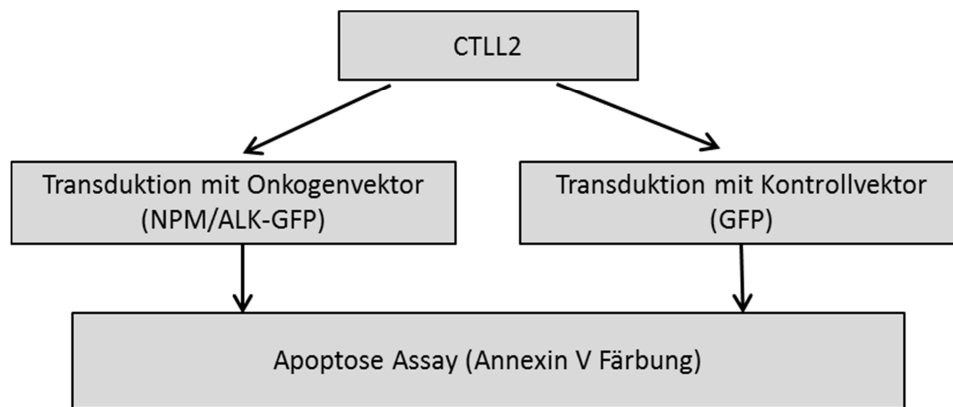


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Versuchsplanung des Apoptose Assay von transduzierten CTLL2

3.4 Versuchsplanung zur Untersuchung der Genexpressionsprofile

Um die direkte Auswirkung von NPM-ALK nach Transduktion auf die Genexpression von T-Zellen (OT1- und P14-Zellen) zu ermitteln, wurden P14- und OT1-Zellen aus Donortieren isoliert (siehe Kapitel 3.7.6), stimuliert (siehe Kapitel 3.7.7) und anschließend mit dem Onkogen- oder Kontrollvektor transduziert. Bereits 24 Stunden nach Transduktion wurden die Zellen auf die GFP-positive Population sortiert. Im Anschluss wurde RNA aus den Zellen isoliert und ein Genexpressionsprofil (siehe Kapitel 3.6.6) erstellt.

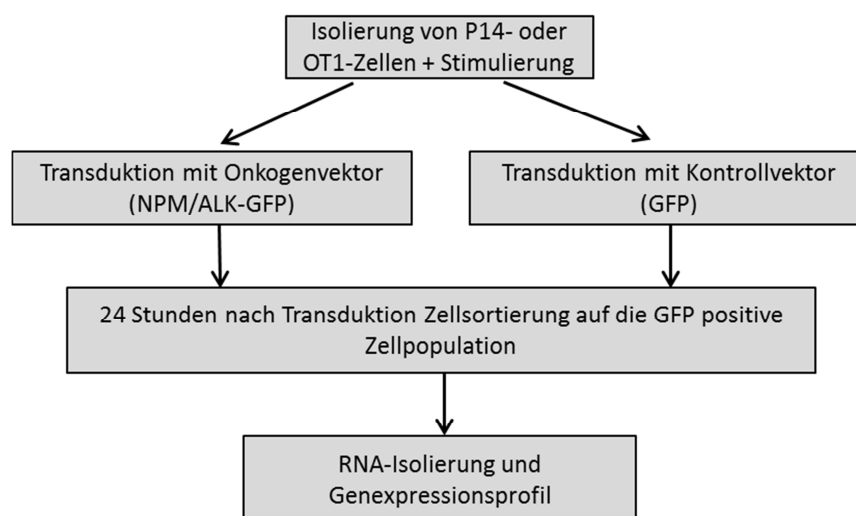


Abbildung 11 Schematische Darstellung der erstellten Genexpressionsprofile

3.5 Versuchsplanung der in-vivo-Versuche

Für die in-vivo-Versuche wurden T-Zellen mit monoklonalen TCR aus P14- und OT1-Mäusen (Tabelle 4) isoliert (siehe Kapitel 3.7.6). Die isolierten T-Zellen wurden in Kultur genommen und mit ihrem spezifischen Peptid (Tabelle 11) stimuliert (siehe Kapitel 3.7.7). Anschließend erfolgte eine doppelte Transduktion (siehe Kapitel 3.7.11) mit dem Onkogenvektor NPM-ALK gekoppelt an die Firefly-Luciferase oder dem Kontrollvektor T-Sapphire gekoppelt an die Firefly-Luciferase (Tabelle 3). Die Empfängertiere (Rag1-) wurden mit 5×10^6 transduzierten TCR-monoklonalen Spender-T-Zellen (OT1, P14) pro Tier intravenös transplantiert (siehe Kapitel 3.9.2). Zur Transplantation der Spenderzellen wurden diese in 200 μ l PBS aufgenommen. Die intravenöse Transplantation wurde erleichtert durch die Fixierung der Empfängertiere in einer Mausefalle und der Dilatation der Schwanzvene mittels Wärme durch eine Rotlichtlampe. Eine schematische Darstellung und der zeitliche Ablauf sind in Abbildung 12 ersichtlich.

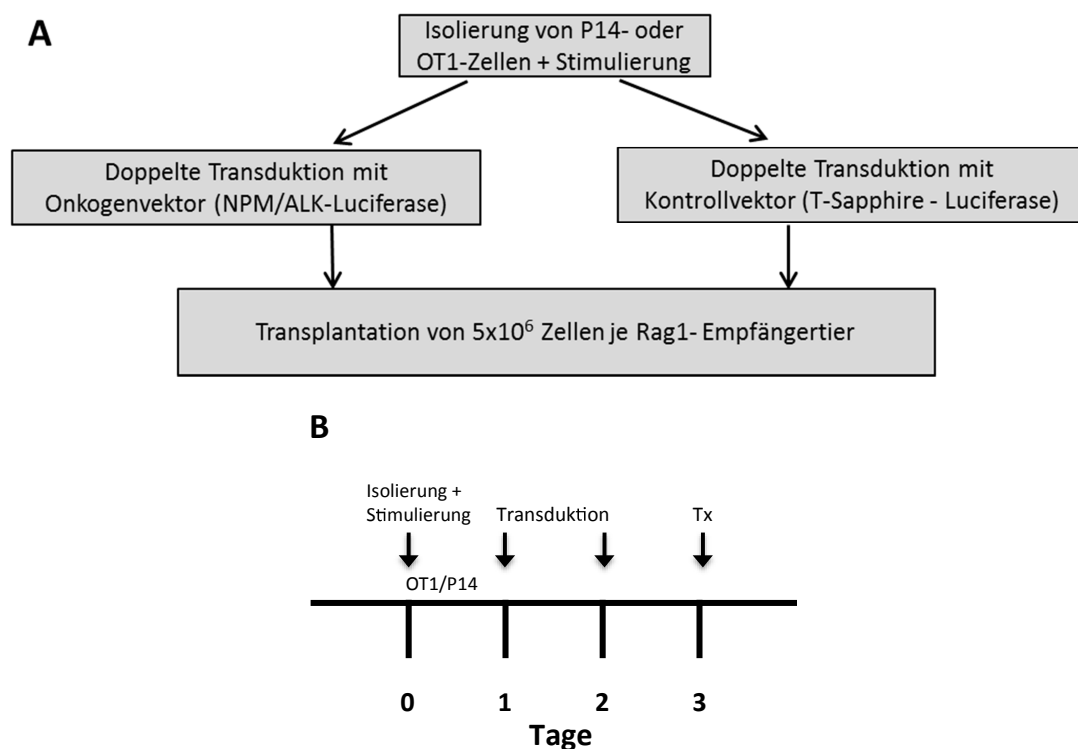


Abbildung 12 Schematische Darstellung des Mausmodells und zeitlicher Ablauf

Nach Transplantation wurden die Empfängertiere regelmäßig einer in-vivo-Biolumineszenzmessung unterzogen (siehe Kapitel 3.9.6) und vier Wochen nach der Transplantation Blut entnommen (Kapitel 3.9.3).

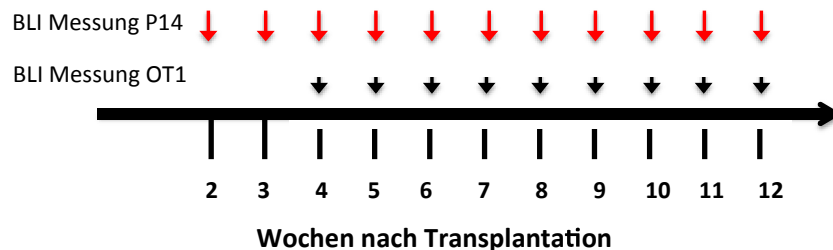


Abbildung 13 Zeitlicher Ablauf der BLI Messung

Mit dem Auftreten von klinisch manifesten Tumoren wurden die Tiere euthanasiert (siehe Kapitel 3.9.4) und die entnommenen Organe für die FACS-Analyse (siehe Kapitel 3.8.3 und 3.8.4) sowie die histologische Untersuchung (siehe Kapitel 3.9.5) aufbereitet.

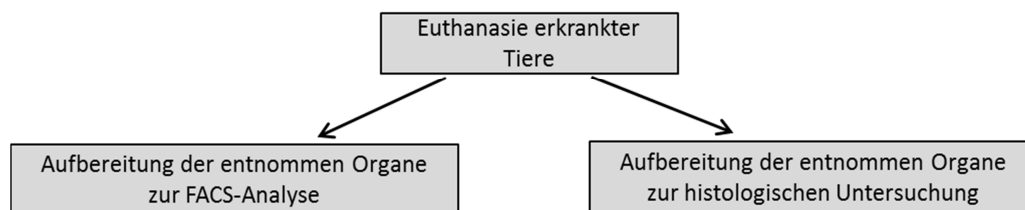


Abbildung 14 Schematische Darstellung der Folgeuntersuchung nach Auftreten eines klinisch manifesten Tumors

3.6 Molekularbiologische Techniken

3.6.1 Gammaretrovirale Vektoren

Alle verwendeten gammaretroviralen Vektoren sind an ihrem 5' und 3' Ende flankiert durch long terminal repeats (LTR) und enthalten hinter dem Kontroll- oder Onkogen die internal ribosome entry site (IRES). Die LTRs dienen der viralen Integration, der Genexpression und der reversen Transkription. Zusätzlich ermöglicht die IRES die Co-Expression von Genen, wie den verwendeten Reportergenen und der Onko- oder Kontrollgene. Die für in-vitro-Versuche verwendeten Vektoren enthalten als Reportergen GFP und als Onkogen NPM-ALK. Vektoren für in-vivo-Imaging Versuche beinhalten als Reportergen die Firefly-Luciferase und als

Kontroll- oder Onkogen T-Sapphire oder NPM-ALK. Zur Verbesserung der Expression des Transgens wurde das Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (wPRE) genutzt.

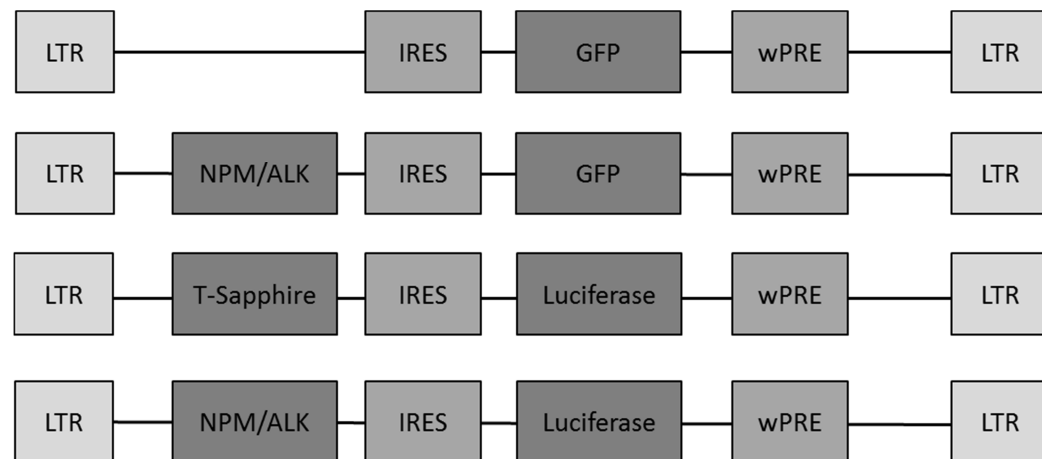


Abbildung 15 Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren

Eine tabellarische Zusammenfassung der verwendeten Plasmide und Vektoren mit ihren Bezugsquellen ist in (Tabelle 3) hinterlegt. Entsprechende Plasmidkarten, erstellt mit der Software Clone Manager der Firma SECentral, sind im Anhang einzusehen.

3.6.2 Bakterientransformation

Zur Produktion von gammaretroviralen Vektoren wurde Plasmid DNA in den E.coli-Stamm TOP10 transformiert. Hierfür wurden 50 µl der chemokompetenten E.coli Bakterien für etwa 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend mit 100 ng Plasmid-DNA vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis folgte eine kurze Inkubation von einer Minute bei 42°C und anschließender 2-minütigen Inkubation auf Eis. Durch den kurzen Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad dehnt sich die bakterielle Membran aus und ermöglicht den Eintritt der Plasmid-DNA in die Bakterien. Nach Zugabe von vorgewärmten 500 µl Lysogeny broth (LB)-Medium wurden die Bakterien weitere 45 Minuten bei 37°C auf dem Schüttelinkubator (200 rpm) inkubiert. Jeweils 30-70 µl der Bakteriensuspension wurden schließlich auf LB-Agarplatten mit zugefügtem Ampicillin ausgestrichen und zum Auswachsen über Nacht bei 37°C im Inkubator gehalten. Die ausgewachsenen Bakterienkolonien wurden am nächsten Tag „gepickt“.

3.6.3 Plasmidpräparation

Nach der Bakterientransformation (siehe Kapitel 3.6.2) wurden die gepickten Bakterienkolonien in 3 ml LB-Medium mit zugefügtem Ampicillin beimpft und über Nacht auf dem Schüttelinkubator (200 rpm) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die analytische DNA-Präparation nach dem Protokoll des Kits JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit der Firma Genomed (Tabelle 15).

Für die präparative Plasmidpräparation wurden 200 µl der über Nacht inkubierten Bakteriensuspension in 200 ml LB-Medium mit zugefügtem Ampicillin überführt und eine weitere Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator (200 rpm) inkubiert. Die anschließende präparative Plasmidpräparation erfolgte nach dem Protokoll des Kits Qiagen Plasmid Maxi Kit von der Firma Qiagen (Tabelle 15). Im Anschluss an die Plasmidpräparation wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe des NanoDrop von peqLab (Tabelle 13) ermittelt.

3.6.4 Isolation von DNA aus Blut, Gewebe und Zellsuspensionen

Zur Isolation von DNA wurden 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen verwendet. Aus Gewebe wurde zunächst eine Zellsuspension hergestellt (siehe Kapitel 3.8.2). Sowohl Blut als auch die hergestellte Zellsuspension aus Gewebe wurden einer Erythrolyse unterzogen und mit PBS gewaschen. Zur Isolation der DNA wurden die Zellen pelletiert und anschließend nach dem Protokoll des DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen (Tabelle 15) bearbeitet. Die isolierte DNA wurde mit 50-200 µl H₂O aufgefüllt und die DNA Konzentration mit dem NanoDrop ermittelt.

3.6.5 Western Blot

3.6.5.1 Lyse von Zellen

Für die Proteinanalyse mittels Western Blot wurden 2×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 200 µl Lysisbuffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und dabei alle 10 min gevortext. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 10 min um Zelltrümmer, Membranbestandteile und Organellen zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.6.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Zelllysate

Bevor die Lysate in die Probenfächer des Gels pipettiert werden konnten, wurden sie zur vollständigen Denaturierung der Proteine 3:1 mit 4x Ladebuffer mit zugesetztem β -Mercaptoethanol resuspendiert und für 10 min bei 99°C im Heizblock aufgekocht. Anschließend wurde in jede Probenfächer des 4-12% oder 12% NuPAGE Bis-Tris Gels der Firma Life Technologies (Tabelle 11) jeweils 25 μ l des Lysats pipettiert. Eine Probenfächer wurde mit 10 μ l dem New England Biolabs (NEB)-Proteinmarker beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100V für etwa 90 min in NuPAGE SDS Running Buffer (Tabelle 11).

3.6.5.3 Transfer der Proteine auf eine Blottingmembran (Elektro-Blotting)

Der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran erfolgte durch Elektro-Blotting. Hierzu musste die Membran zunächst in Methanol für 5 min inkubiert, anschließend in H₂O gewaschen werden und wurde schließlich in TOWBIN (Tabelle 12) equilibriert. Der Blot wurde in der Transferkassette in folgender Reihenfolge zusammengebaut: 1. Schwamm, 2. Filterpapier, 3. Gel, 4. Membran, 5. Filterpapier, 6. Schwamm. Um Luftblasen im Blotting-Sandwich (Tabelle 14) zu vermeiden, wurden diese mit einem kleinen Roller entfernt. Im Anschluss wurde die Transferkassette in den Tank eingesetzt und mit Transferpuffer befüllt. Bei einer konstanten Spannung von 750 mA für 30 min erfolgte der Proteintransfer.

3.6.5.4 Immundetektion durch Chemilumineszenz

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran dreimal für 5 min in TBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1x Roti-Block unter ständigem Schwenken blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde als nächstes die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tabelle 1) ebenfalls unter Schwenken bei 4°C über Nacht durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran im Anschluss an mehrere Waschschrift mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 1) unter Schwenken für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation erfolgte ein weiterer Waschschrift für 15 min. Für die chemilumineszente Detektion der Proteine wurde die Membran mit dem ECL-Plus Western Blot Kit (Tabelle 15) nach Herstellerangaben der Firma GE Healthcare Life Sciences behandelt. Die Analyse und Auswertung erfolgte mit dem Imaging-System Fusion (Tabelle 13) der Firma peqLab.

3.6.6 Genexpressionsprofile

Die Isolierung von RNA für Genexpressionsprofile wurde aus 4×10^5 bis 1×10^6 Zellen nach dem Herstellerprotokoll der Firma Qiagen mit dem RNeasy Mini Kit vorgenommen. Die RNA Amplifikation und die Kennzeichnung der cDNA wurde nach dem Standardprotokoll des Ovation Pico WTA System V2 Amplification Kit und dem Standardprotokoll des Encore Biotin Module labelling Kit von der Firma NuGEN durchgeführt. Die Microarray Hybridisierung auf den GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Arrays (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA), Waschschrte und das Scannen der Microarrays erfolgte nach dem Standardprotokoll der Firma Affymetrix. Die statistische Analyse wurde mit der Software R Version 2.12 (R Development Core Team, 2005) sowie mit Zusatzsoftware des Bioconductor Projekts durchgeführt (160).

Die Normalisierung des SONDENSIGNALS wurde nach der Varianzstabilisierungsmethode nach Huber et al. durchgeführt (161). Diese Methode macht die Varianz der Sondenintensität nahezu unabhängig von dem erwarteten Expressionsniveau. Die Parameter (Offset und ein Skalierungsfaktor) wurden für jeden Microarray in Anbetracht der Tatsachen, dass der gleiche Anteil an Sonden nicht unterschiedlich exprimiert wird in den Proben, geschätzt. In Anbetracht der Berechnungskomplexität der Algorithmus-Parameter wurde eine zufällige Teilmenge an Sonden zur Umwandlung des gesamten Arrays geschätzt.

Die SONDENSET-ZUSAMMENFASSUNG der normalisierten Daten wurde mit der Medianpolish-Methode kalkuliert (162). Für jedes SONDENSET wurde ein robustes additives Modell für den Array angepasst, welches die unterschiedliche Sensitivität der SONDENSETS über den SONDENEFFEKT berücksichtigt.

Die Verarbeitung der Proben und Anfertigung der Genexpressionprofile wurde am Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie in der Gruppe von Dr. Claudia Döring durchgeführt.

3.7 Zellkulturarbeiten

3.7.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter „Sterilbänken für Zellkulturen“ biologische Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Alle verwendeten Materialien, welche für die Arbeiten in der Zellkultur benötigt wurden, durchliefen einen Autoklaviervorgang oder wurden mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Dies galt auch für Handschuhe, Verbrauchsmaterialien und die

Arbeitsflächen der Sterilbänke. Alle verwendeten Zelllinien und murine, isolierte Primärzellen wurden in begasten (5-7% CO₂) Brutschränken bei einer Temperatur von 37°C und Luftfeuchte von 80-90%, in Kultur gehalten.

3.7.2 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die Verpackungszelllinie 293T und die zur Titration verwendete Zelllinie SC1 wurden in DMEM complete (Tabelle 16) gehalten. Alle 2-3 Tage, wenn der Flaschenboden zu 70-80% mit Zellen bedeckt war, wurden die Zellen passagiert. Für die Passagierung wurde zunächst das Zellkulturmedium vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die adhärenenten Zellen durch Inkubation mit Trypsin-EDTA (Tabelle 11) für 2-5 min vom Flaschenboden gelöst. Die gelösten Zellen wurden in frischem Medium verdünnt (in Abhängigkeit der Wachstumsrate 1:10 oder 1:5) und in eine neue Kulturflasche überführt.

3.7.3 Kultivierung von Suspensionszellen

Die zytotoxische T-Zelllinie CTLL2 wurde in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml in IMDM CTLL2 (Tabelle 16) gehalten. Alle 2-3 Tage wurde eine Zellzahlbestimmung (siehe Kapitel 3.7.4) durchgeführt und die Zellen wieder auf ihre Ausgangsdichte verdünnt und in eine neue sterile Zellkulturflasche überführt. Die Zugabe von 300 Units IL2 pro ml Medium erfolgte immer unmittelbar mit der Zugabe des frischen Mediums.

3.7.4 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl 0,05%iger Trypanblau-Lösung vermischt. 10 µl des Zell-Trypanblau Gemischs wurden in eine Neubauer Einmal-Zählkammer pipettiert. Die durch Trypanblau gefärbten toten Zellen wurden in der Zellzählung nicht berücksichtigt (Lebendzählung). Es wurden alle vier Großquadrate ausgezählt. Die Zelldichte wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = \left(\frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} \right) \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

3.7.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden 1×10^7 Zellen mit PBS gewaschen und per Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Gefriermedium (10% DMSO in FBS) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden über Nacht in einer

Gefrierbox in einem -80°C Gefrierschrank langsam runtergekühlt. Am nächsten Tag wurden die Zellen aus der Gefrierbox entnommen und die Kryoröhrchen bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Eingefrorene Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in ein 50 ml Röhrchen mit frischem Medium überführt. Das jeweils verwendete Medium für die unterschiedlichen Zelllinien oder Primärzellen ist in Tabelle 16 hinterlegt. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt.

3.7.6 Isolierung von primären murinen T-Zellen

Für die Isolierung primärer muriner T-Zellen fungierten OT1- oder P14-Mäuse. Nach Euthanasie (siehe Kapitel 3.9.4) der Spendertiere wurden die Milz sowie axiale, inguinale und mesenteriale Lymphknoten entnommen. Die isolierten Organe wurden in ein 50 ml Röhrchen mit kaltem PBS überführt.

Zur Homogenisierung wurden die Organe mit dem sterilen Stempel einer Spritze durch ein 100 µm Zellsieb von BD (Tabelle 14) in eine Petrischale gedrückt, in PBS aufgenommen und durch ein weiteres steriles 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen überführt. Im Anschluss wurde das Homogenisat bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Erythrolyse wurde das entstandene Zellpellet in 1-3 ml Lysis Buffer (10x) der Firma BD Franklin (1:10 Verdünnt mit H₂O) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 7 min bei Raumtemperatur wurden 10 ml PBS zugegeben und erneut bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Waschschriff (Zugabe von PBS mit anschließender Zentrifugation) wurden die Zellen ein weiteres Mal in 10 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl (siehe Kapitel 3.7.4) der Zellsuspension bestimmt.

3.7.7 Stimulierung isolierter primärer murinen T-Zellen mit monoklonalem TCR

Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen in einer Zelldichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Mouse special Medium (Tabelle 16) aufgenommen und in einer 6-Well-Zellkulturplatte der Firma Costar (Tabelle 14) in Kultur genommen. In jede Vertiefung der 6-Well-Zellkulturplatte wurden 3 ml Zellsuspension ($7,5 \times 10^6$ Zellen) kultiviert. Der Kultur wurden pro ml 10 Units humanes IL2 der Firma Novartis (Tabelle 11) zugegeben.

Aufgrund der Monoklonalität des TCR von OT1- und P14 T-Zellen konnten die T-Zellen mit ihrem jeweiligen spezifischen Peptid für den monoklonalen TCR stimuliert werden. Für die

OT1 Zellen wurde das OVA-Peptid in einer Konzentration von 10 ng/ml und für die P14 Zellen das gp33-Peptid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml der Zellkultur hinzugefügt. In Abhängigkeit der Proliferation der Zellen wurden sie nach einem Tag gesplittet und konnten für die Transduktion eingesetzt werden.

3.7.8 Transfektion und Produktion ecotroper Viruspartikel

Für die Herstellung von gammaretroviralen Vektorpartikeln wurde das sogenannte Drei-Plasmid-System verwendet. Der verwendete Transfervektor kodierte das Transgen (Onkogen oder Kontrollgen), das Verpackungssignal Ψ und die LTRs (long terms repeats). Durch das Fehlen von Virusproteinen konnte der Transfervektor nur in trans an einer unbekannten Stelle in das Wirtsgenom eingebaut werden. Hierzu wurden zwei Hilfsplasmide verwendet, welche die fehlenden Strukturgene für Replikation (gagpol-Gen) und Verpackung (ect-env-Gen) codierten.

Zur transienten Transfektion wurde die humane Nierenepithelzelllinie 293T verwendet. Die Transfektion erfolgte mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation. Nach Transfektion gaben die Verpackungszellen die exprimierten Gene in verpackten, infektiösen Viruspartikeln an das Kulturmedium ab. Die so produzierten gammaretroviralen Vektorpartikel waren replikationsinkompetent und auf einen Infektionszyklus beschränkt, da sie nur die genetische Information des Transfervektors trugen.

Für die Methode der Calcium-Phosphat-Präzipitation wurden einen Tag vor der transienten Transfektion 5×10^6 293T Zellen in 6 ml DMEM complete Medium (Tabelle 16) aufgenommen, in einer Zellkultur-Petrischale (\varnothing 10 cm) ausgesät und über Nacht unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert (siehe Kapitel 3.7.1). Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurde dem Zellkulturmedium der 293T Zellen kurz vor Transfektion 25 µM Chloroquine (Tabelle 11) zugefügt. Zur Transfektion wurde der folgende DNA/ CaCl_2 -Mix in einem 15 ml Röhrchen angesetzt.

Tabelle 5 Herstellung DNA/ CaCl_2 Mix

Transfervektor (P3, P52, P53, M387)	7,5 µl
Hilfsplasmid gag/pol (M579)	12,5 µl
Hilfsplasmid Ecoenv (M187)	1 µl
H ₂ O ad	450 µl
2,5 M CaCl_2	50 µl

Die 500 µl DNA/CaCl₂-Lösung wurde tröpfchenweise unter ständigem Mischen, durch Erzeugen von Luftblasen mit einer Pasteurpipette, in 500 µl 2xHEPES Puffer (Tabelle 12) pipettiert. Um eine optimale Präzipitation der DNA in die Calciumphosphatkristalle zu gewährleisten, wurde das Gemisch für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das DNA-Präzipitat vorsichtig auf die 293T-Zellen pipettiert und die Zellen weiterhin unter normalen Kulturbedingungen gehalten (siehe Kapitel 3.7.1). Vier Stunden nach Zugabe des DNA-Präzipitats wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und durch 5 ml frisches DMEM complete Medium ersetzt. Nach weiteren 12 Stunden wurde das Zellkulturmedium ein weiteres Mal abpipettiert und durch 5 ml frisches DMEM complete Medium ersetzt.

Etwa 36 Stunden nach Transfektion wurde das Viruspartikel enthaltende Medium vorsichtig mit einer 10 ml Spritze aufgesogen und durch einen sterilen Filter in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden erneut mit 5 ml DMEM complete Medium versorgt. Der Zellkulturüberstand wurde 48 Stunden nach Transfektion ein weiteres Mal mit einer 10 ml Spritze abgesogen und durch einen sterilen Filter in ein 50 ml Röhrchen überführt.

Die so gewonnenen Viruspartikel enthaltenden Zellkulturüberstände wurden auf SC1-Zellen titriert, um die Transduktionseffizienzen zu ermitteln (siehe Kapitel 3.7.9), und bis zur weiteren Verwendung bei +4°C für maximal zwei Wochen gelagert.

3.7.9 Ermittlung der Transduktionseffizienz der produzierten ecotropen Viruspartikel auf SC1 Zellen

Zur Ermittlung der Transduktionseffizienz der produzierten gammaretroviralen Überstände wurden diese auf SC1-Zellen titriert. Hierfür wurden 5×10^4 SC1-Zellen in DMEM complete (Tabelle 16) je Vertiefung einer 24 Well-Zellkulturplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die retroviralen Überstände in Verdünnungen von 1:1 bis 1:100 auf die SC1-Zellen pipettiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen aus der 24-Well Zellkulturplatte gelöst. Zum Lösen der Zellen wurde das Zellkulturmedium abpipettiert, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend eine Trypsinierung durchgeführt. Die so gelösten Zellen wurden in 1 ml DMEM complete aufgenommen und die Transduktionseffizienz mittels FACS (fluorescence-activated cell sorting, *deutsch*: Durchflusszytometrie) ermittelt (siehe Kapitel 3.8.). Die Transduktionseffizienz für gammaretrovirale Überstände von Vektoren, welche GFP oder T-Sapphire enthielten, konnte direkt über den prozentualen Anteil der GFP oder T-Sapphire positiven Zellen mittels FACS-Analyse ermittelt werden. Zur Ermittlung der Transduktionseffizienz NPM-ALK enthaltender Virusüberstände ohne GFP oder T-Sapphire

wurde nach Durchführung des Fix and Perm (Tabelle 15) Protokolls intrazellulär mit dem humanen NPM-ALK Antikörper (Tabelle 1) gefärbt (siehe Kapitel 3.8.4) und mittels FACS der Anteil an NPM-ALK positiven Zellen ermittelt.

3.7.10 Aufkonzentrieren von Vektorüberständen

Zur Verbesserung der Transduktionseffizienzen wurden die gammaretroviralen Vektorüberstände teilweise für die Transduktion auf primäre murine T-Zellen aufkonzentriert. Hierfür wurde das Herstellerprotokoll des RetroX Concentrators von Takara (Tabelle 11) angewendet.

3.7.11 Retrovirale Transduktion mit Retronektin beschichteten Platten

Zur Verbesserung der Transduktion wurden murine primäre T-Zellen und die zytotoxische T-Zelllinie CTLL2 auf Retronektin beschichteten Platten transduziert.

Zur Herstellung der Retronektin beschichteten Platten wurde in jede Vertiefung einer unbeschichteten 6-Well Platte (Tabelle 14) 1 ml Retronektin (Tabelle 11) pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Retronektin abpipettiert und die Platten mit 1 ml 2% BSA in PBS für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Nach einmaligem Waschen mit 1x HBSS (Tabelle 11) und PBS wurden 3-5 ml der gammaretroviralen Überstände in jede Vertiefung pipettiert und die 6-Well Platte bei 3100 rpm für 90 min und 31°C zentrifugiert. Im Anschluss der Zentrifugation und Entfernung der Virusüberstände aus den Platten folgte die Transduktion der Zellen. Für die Transduktion von CTLL2 wurden 3 ml Zellsuspension in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml in jede Vertiefung pipettiert. Die Retronektin beschichteten Platten mit enthaltener Zellsuspension wurden bei 1900 rpm für 60 min und 31°C zentrifugiert. Nach 24 Stunden wurde die Transduktionseffizienz mittels FACS überprüft.

OVA stimulierte OT1-Zellen und gp33 stimulierte P14-Zellen (siehe Kapitel 3.7.7) wurden in 3 ml Medium in einer Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml transduziert. Die Transduktion wurde 24 Stunden nach der ersten Transduktion mit einer neuen Retronektin beschichteten Platte wiederholt. Einen Tag nach der zweiten Transduktion wurde die Transduktionseffizienz der Zellen sowie Expression der Marker CD3, CD4, CD8, CD19, CD30, TCR_{ab} und ICOS mittels FACS ermittelt. Danach standen die Zellen zur Transplantation (siehe Kapitel 3.9.2) bereit.

3.8 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie wurde eingesetzt, um nach intra- oder extrazellulärer Antikörperbindung die Expression von Zellmarkern sowie den Phosphorylierungsstatus von Schlüsselproteinen zu analysieren. Zusätzlich wurden mittels FACS spezifische transduzierte Zellpopulationen sortiert. FACS-Analysen wurden durchgeführt am MACSQuant-Analyser der Firma Miltenyi Biotec und die Sortierung von Zellen am BD FACSAria II. Die verwendeten Antikörper sind aus Tabelle 1 zu entnehmen. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software.

3.8.1 Aufbereitung von Vollblut für die Antikörperfärbung

Um Antigen aus dem Vollblut der Empfängertiere mit Antikörpern zu nachzuweisen, musste das Vollblut zunächst erythrolysiert werden. Hierzu wurden auf 20 µl Vollblut 200 µl Lysis Buffer (1:10 in H₂O verdünnt) pipettiert und für 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit 2 ml PBS gewaschen und bei 1500 rpm für 5 min und 21°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde die Antikörperfärbung wie in Kapitel 3.8.3 beschrieben durchgeführt.

3.8.2 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen zur FACS Analyse

Aus den bei der Sektion (siehe Kapitel 3.9.4) entnommenen Organen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt. Hierzu wurden die Organe mit dem sterilen Stempel einer Spritze durch ein 100 µm Zellsieb in eine sterile Petrischale gedrückt. Im Anschluss wurden die zerdrückten Organbestandteile in PBS aufgenommen und durch ein weiteres steriles 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen überführt. Das entstandene Homogenisat wurde bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde einer Erthroylyse unterzogen. Hierzu wurde das Zellpellet in 1-3 ml Lysis Buffer (1:10 verdünnt mit H₂O) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 7 min bei Raumtemperatur wurden 10 ml PBS zugegeben und erneut bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen gezählt (siehe Kapitel 3.7.4) und waren bereit für die extra- oder intrazelluläre Detektion spezifischer Antigene (siehe Kapitel 3.8.3 und 3.8.4).

3.8.3 Detektion extrazellulärer Antigene in Einzelzellsuspensionen

Für die extrazelluläre Antikörperdetektion wurden $2\text{-}5 \times 10^5$ Zellen in ein FACS-Röhrchen von Sarstedt (Tabelle 14) überführt. Nach Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min und 21°C wurde der Überstand verworfen und dem Restvolumen 1 μl FcR Block und 1 μl Antikörper (Tabelle 1) zugesetzt. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen mit nachfolgender Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min bei 21°C . Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 μl PBS resuspendiert. Im direkten Anschluss wurde der Anteil der Antikörper markierten Zellen im FACS analysiert.

3.8.4 Intrazelluläre Antikörperdetektion von Einzelzellsuspensionen

Für die intrazelluläre Antikörperfärbung wurden 1×10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min und 21°C wurde der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen nach dem Herstellerprotokoll des Fix and Perm Cell Permeabilization Kits der Firma Invitrogen (Tabelle 15) fixiert, permeabilisiert und mit dem entsprechenden Antikörper gefärbt.

3.8.5 Apoptose Assay mittels FACS-Analyse

Mit der zytotoxischen T-Zelllinie CTLL2 wurde nach Transduktion (siehe Kapitel 3.7.11) mit dem Onkogenvektor NPM-ALK oder dem Kontrollvektor ein Apoptose Assay durchgeführt. Hierfür wurden 1×10^6 transduzierte Zellen in FACS-Röhrchen überführt und bei 1500 rpm für 5 min und 21°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen nach dem Herstellerprotokoll des Annexin V Apoptosis Detection Kit von BD (Tabelle 15) behandelt und direkt im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert.

3.8.6 Intrazelluläre Detektion von phosphorylierten Proteinen

Für die Detektion von phospho-Proteinen wurden $1\text{-}2 \times 10^6$ Zellen bei 1500 rpm für 5 min und 21°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in vorgewärmten Lyse/Fix Buffer von BD (Tabelle 11) (1:5 in H_2O verdünnt) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C wurden die Zellen mit Stain Buffer (3% FBS in PBS) gewaschen und pelletiert. Anschließend folgte nach Zugabe von Perm Buffer III eine 30-minütige Inkubation auf Eis mit darauffolgendem Waschschrift. Nun konnte den Zellen 1 μl FcR Block und 5 μl phospho-Antikörper (Tabelle 1) (Konzentration 50000 Units/ml) zugegeben werden. Die Zellen wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Nach einmaligem Waschen

wurden die Zellen in 200-300 µl Stain Buffer resuspendiert und direkt im Anschluss per FACS analysiert.

3.8.7 Sortieren von Zellpopulationen

Zum Sortieren von Zellpopulationen wurden $2-3 \times 10^7$ Zellen bei 1500 rpm für 5 min und 21°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmalig in PBS gewaschen und erneut pelletiert. Die Zellen wurden in PBS mit 2% FBS in einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen pro ml aufgenommen. Nach vorsichtigem Pipettieren durch ein 100 µm Zellsieb wurden die Zellen bis zur Sortierung auf Eis gelagert. Im Anschluss an die Zellsortierung wurde die sortierte Zellpopulation einmalig mit PBS gewaschen und in frischem Medium in Kultur genommen.

3.9 Tierexperimentelle Methoden

3.9.1 Tierhaltungsbedingungen

Die Labormäuse wurden in individuell ventilierten Käfigen (individually ventilated cage, IVC), Firma Tecniplast) mit Überdrucksystem in der Tierhaltungsanlage des Georg-Speyer-Hauses gehalten. Die Räumlichkeiten wurden ausschließlich mit Schutzkleidung (Überschuhe, Mundschutz, Handschuhe, Kittel) betreten. Die Versuchstiere wurden täglich adspektorisch und bei Auffälligkeiten palpatorisch untersucht. Die Haltungsbedingungen sowie die Tötung der Tiere erfolgte nach den Richtlinien der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA). Alle durchgeführten In-vivo-Experimente waren genehmigt durch das Regierungspräsidium Darmstadt unter der Tierversuchsnummer F21/03.

3.9.2 Transplantation von OT1- und P14-Zellen

Nach Isolierung von OT1- und P14-Zellen (siehe Kapitel 3.7.6) mit anschließender Stimulierung (siehe Kapitel 3.7.7) und doppelter Transduktion (siehe Kapitel 3.7.11) wurden die Zellen auf ihre Transduktionseffizienz und die Expression der Marker CD3, CD4, CD8, CD19, CD30, TCR_{ab} und ICOS mittels FACS Analyse (siehe Kapitel 3.8) untersucht. Die Empfängertiere (Rag 1-) wurden mit jeweils 5×10^6 Zellen transplantiert. Zur Transplantation der Spenderzellen wurden diese in 200 µl PBS in einer Insulinspritze aufgenommen. Die Transplantation erfolge i.v. (intravenös) in die Vena caudalis mediana (Schwanzvene). Die intravenöse Transplantation wurde erleichtert durch die Fixierung der Empfängertiere in einer Mausefalle der Firma LabArt und die Dilatation der Schwanzvene mittels Wärme durch eine Rotlichtlampe.

3.9.3 Blutabnahme

Die Blutabnahme bei den Versuchsmäusen erfolgte aus der lateralen Schwanzvene. Hierzu wurden die Mäuse in einer Mausefalle fixiert und die Schwanzvene mittels Rotlicht dilatiert. Mit einem sterilen Skalpell wurde an der lateralen Vene eine Inzision vorgenommen und circa 20-80 µl Blut mit einer EDTA-beschichteten Mikrovette aufgenommen. Die Inzision am Schwanz wurde nach Blutabnahme mit einem Tupfer abgedrückt bis die Blutung zum Stillstand kam. Das Blut wurde anschließend zur Analyse mittels FACS vorbereitet (siehe Kapitel 3.8.1).

3.9.4 Tötung und Sektion der Versuchstiere

Klinisch erkrankte Tiere und Spendertiere wurden in einem offenen System mittels Einleitungsbox mit einer Isoflurankonzentration von 3% narkotisiert und anschließend durch cervicale Dislokation euthanasiert. Mit einer Insulinspritze erfolgte die Blutabnahme durch Herzpunktion. Für die Sektion der Mäuse wurden diese in Rückenlage fixiert, die Haut mit 70%igem Alkohol desinfiziert und nach einer Inzision an der Linea alba von caudal nach cranial eröffnet. Alle makroskopischen Veränderungen wurden dokumentiert. Lymphknoten (axial, inguinal, mesenterisch), Milz, Leber, Nieren, Lunge, Femur und Tibia wurden entnommen. Die entnommenen Organe, welche im Anschluss mittels FACS-Analyse untersucht werden sollten, wurden in ein 50 ml Röhrchen mit PBS überführt. Das Röhrchen wurde bis zur weiteren Aufbereitung der Organe zur FACS Analyse (siehe Kapitel 3.8.2) auf Eis gelagert. Entnommene Organe zur histologischen Untersuchung (siehe Kapitel 3.9.5) wurden in ein 50 ml Röhrchen mit 4%iger Formaldehydlösung überführt.

3.9.5 Histologische Untersuchung

Entnommene Organe wurde über Nacht in 4%iger Formaldehydlösung eingelegt. Nach Überführung in Histosetten von Sanowa wurden die Organe ein weiteres Mal für mindestens 2 Stunden in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Nach Entwässerung der Organe mit Alkohol wurden sie in Paraffin eingebettet. Zur Einbettung in Paraffin wurde 60°C warmes flüssiges Paraffin verwendet, sodass ein schneidbarer Paraffinblock entstand. Die Paraffinblöcke wurden mit dem elektronischen Mikrotom pfm Slide 4003 von pfm Medical in 2-10 µm dicke Scheiben geschnitten. Nachdem die Gewebescheiben auf Objektträger aufgebracht wurden, folgte eine Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung und bei Bedarf eine immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis von NPM-ALK. Die Verarbeitung und Färbungen der Proben

wurde am Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie durch Frau Smaro Soworka durchgeführt.

3.9.6 In-vivo-Biolumineszenzmessungen

Die in-vivo-Biolumineszenzmessung wurde durchgeführt, um die Lymphomagenese der Onkogen-induzierten Lymphome im Tier beobachten zu können. Hierzu wurden die Empfängertiere, welche mit Luciferase Vektor transduzierten OT1- oder P14-Zellen transplantiert wurden, in wöchentlichen Abständen auf biolumineszente Strahlung gemessen. Für das Biolumineszenz Imaging wurden die Mäuse mit dem XGI-8 Anesthesia System (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) in eine Isofluran Narkose versetzt. Bei dem Gerät handelt es sich um ein offenes System. Die Einleitung der Narkose erfolgte bei einer 3- bis 5%igen Isoflurankonzentration in einer Einleitungsbox. Nach Eintritt der Narkose wurde den Mäusen die gesamte ventrale Körperfläche mit einer Schermaschine rasiert und 150 µl D-Luciferin (15mg/ml) i.p. (intraperitoneal) injiziert. Im Anschluss wurden die Tiere in das IVIS Imaging System Lumina II (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) in dorsaler Lage gelegt. Im Gerät wurde die Narkose mit einer Isoflurankonzentration von 1 bis 3% aufrechterhalten. Die Aufnahmen wurden 10 min nach i.p. Injektion des D-Luciferins in dorsaler und rechter laterolateraler Lage bei einer Belichtungszeit von 30 sek, 1 min und 2 min durchgeführt. Im Anschluss an die Aufnahmen wurden die Versuchstiere zurück in ihren Käfig gelegt und standen bis zum vollständigen Aufwachen unter Beobachtung. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mittels der Living Image Software 4.0 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA).

4 Ergebnisse

In einem Mausmodell der AG Newrzela wurde mittels biolumineszenter Bildgebung die Repopulationsdynamik von NPM-ALK transduzierten TCR transgenen T-Zellen (OT1-Zellen) in Rag-defizienten Empfängertieren untersucht. Interessanterweise waren die genmodifizierten T-Zellen bis zur Entstehung von klinisch manifesten Lymphomen in der in-vivo-Biolumineszenzmessung nahezu nicht nachweisbar. Im Gegensatz hierzu konnten die T-Zellen in den Kontrolltieren, welche mit Kontrollvektor (T-Sapphire) transduzierten T-Zellen transplantiert waren, über den gesamten Versuchsverlauf detektiert werden. Da es völlig unklar war, warum die NPM-ALK transduzierten T-Zellen in der in-vivo-BLI nicht nachweisbar waren, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zunächst der Effekt von NPM-ALK auf die zytotoxische T-Zelllinie CTLL2 in-vitro untersucht. Eine weitere Beobachtung aus dem erwähnten Mausmodell zeigte sich im Ursprung der NPM-ALK induzierten Lymphome, die Lymphome schienen alle ihren Ursprung im poplitealen Lymphknoten zu nehmen. Um diese Beobachtung genauer zu beleuchten, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation das bereits etablierte Mausmodell genutzt, um mögliche TCR abhängige Verteilungsmuster von NPM-ALK transduzierten TCR transgenen T-Zellen (OT1 und P14) zu untersuchen.

4.1 Analyse der zytotoxischen T-Zelllinie CTLL2

Um den Effekt von NPM-ALK auf T-Zellen genauer zu untersuchen, wurde die IL2 abhängige T-Zelllinie CTLL2 genutzt und in-vitro analysiert. Die Zellen wurden mit dem Onkogenvektor NPM-ALK gekoppelt an GFP (im Weiteren nur noch als NPM-ALK bezeichnet) transduziert. Als Kontrollzellen fungierten CTLL2 transduziert mit dem Kontrollvektor GFP. Die transduzierten CTLL2 wurden über mehrere Wochen in Kultur gehalten und alle 2-3 Tage passagiert.

4.1.1 Transduktionseffizienzen transduzierter CTLL2-Langzeitkulturen

Nach erfolgreicher Transduktion der CTLL2-Zellen wurden die Transduktionseffizienzen über die GFP-Expression mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die mit dem Kontrollvektor GFP transduzierte CTLL2-Kultur zeigte 24 Stunden nach Transduktion einen Anteil von 12,4% GFP positiver Zellen (Abbildung 16B). Für das Onkogen NPM-ALK wurden zwei Kulturen angesetzt. In der Kultur CTLL2-NPM/ALK-niedrig (Abbildung 16B) konnte eine

Transduktionseffizienz von 5% und in der Kultur CTLL2-NPM/ALK-hoch (Abbildung 16C) ein Anteil an GFP positiven Zellen von 17,5% 24 Stunden nach Transduktion ermittelt werden.

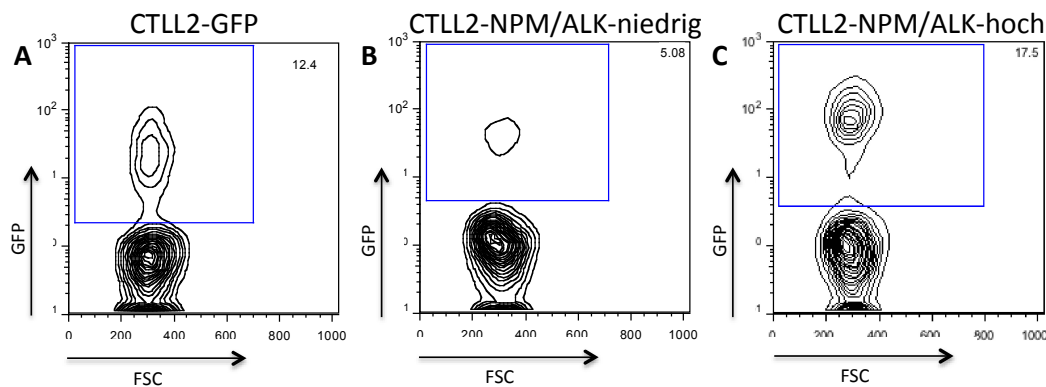


Abbildung 16 Transduktionseffizienzen der CTLL2 Kulturen im FACS-Blot

CTLL2 wurden mit dem Onkogenvektor NPM-ALK oder dem Kontrollvektor GFP transduziert. Ein Tag nach Transduktion wurden die Transduktionseffizienzen mittel FACS (GFP Expression) ermittelt. Die mit dem Kontrollvektor angesetzte Kultur (CTLL2-GFP) zeigte eine Transduktionseffizienz von 12,4% (A). Für das Onkogen NPM-ALK wurden zwei Kulturen angesetzt, eine niedrig transduzierte mit 5% GFP positiven Zellen (CTLL2-NPM/ALK-niedrig) (B) und eine hohe mit 17,5% GFP positiven Zellen (CTLL2-NPM/ALK-hoch) (C).

4.1.2 Entwicklung der GFP-Expression in transduzierten CTLL2-Langzeitkulturen

Die transduzierten CTLL2-Kulturen wurden über mehrere Wochen in Kultur gehalten. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen passagiert und mit frischem Medium sowie 300 Units humanen IL2 pro ml Medium versorgt. Vor jeder Passagierung wurde der Anteil GFP positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die mit dem Kontrollvektor transduzierte Kultur CTLL2 GFP zeigte im Verlauf von 15 Tagen einen konstanten Anteil an GFP positiven Zellen von 12-13% (Abbildung 17A). Nach 15 Tagen wurden die Zellen auf die GFP positive Zellpopulation sortiert, um weiterführende Analysen durchzuführen. Im Gegensatz zu der Kontrollkultur konnte in den beiden NPM-ALK transduzierten Kulturen bereits bei der zweiten FACS Analyse nahezu keine GFP-Expression mehr nachgewiesen werden. Ab dem 30. Tag nach Transduktion stieg sowohl in der Kultur CTLL2-NPM/ALK-niedrig als auch in der Kultur CTLL2-NPM/ALK-hoch der Anteil der GFP-positiven Zellen wieder rapide an. Bis zum Tag 90 nach Transduktion zeigte sich in beiden CTLL2-NPM/ALK Kulturen eine GFP Expression von fast 100% (Abbildung 17B-C). Die beiden Kulturen wurden am Tag 90 nach Transduktion ebenfalls für weiterführende Analysen auf die GFP positiven Zellen sortiert.

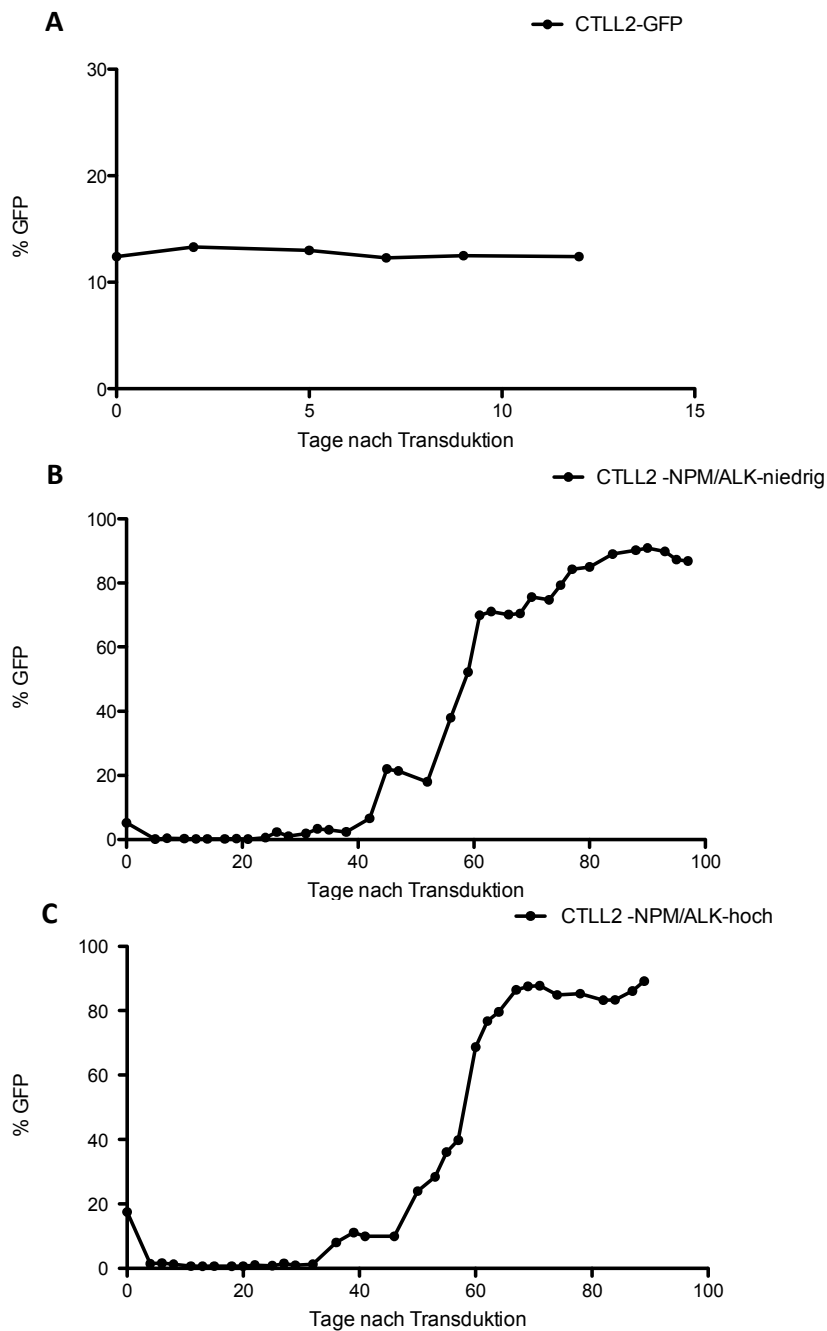


Abbildung 17 GFP Expression der transduzierten CTLL2-Langzeitkulturen

A. In der Kontrollkultur CTLL2-GFP zeigte sich über den gesamten Versuchsablauf eine konstante GFP-Expression von 12-13%. In den Onkogenkulturen, CTLL2-NPM/ALK-hoch (B) und CTLL2-NPM/ALK-niedrig (C), war kurz nach Transduktion über einen Zeitraum von 30 Tagen nahezu keine GFP-Expression nachweisbar. Ab dem 30. Tag kam es in beiden Kulturen zum rapiden Anstieg der GFP-positiven Zellen.

4.1.3 NPM-ALK transduzierte zytotoxische T-Zellen gehen in Apoptose

Das Phänomen des rapiden Abfalls der GFP-positiven Zellpopulation mit anschließendem Anstieg konnte auch in weiteren Transduktionsversuchen mit NPM-ALK in CTLL2 beobachtet werden. Um dies genauer zu untersuchen, wurden CTLL2 erneut mit dem Onkogenvektor NPM-ALK transduziert und ein Apoptose Assay mittels FACS-Analyse ab dem ersten Tag nach Transduktion in regelmässigen Abständen durchgeführt. Die Detektion von apoptotischen Zellen erfolgte durch eine Annexin V Färbung der Zellen, nekrotische Zellen wurden ermittelt durch DNA Färbung mit 7AAD. Im Apoptose Assay zeigte sich, dass die NPM-ALK transduzierten CTLL2 vermehrt in Apoptose und Nekrose gehen (Abbildung 18).

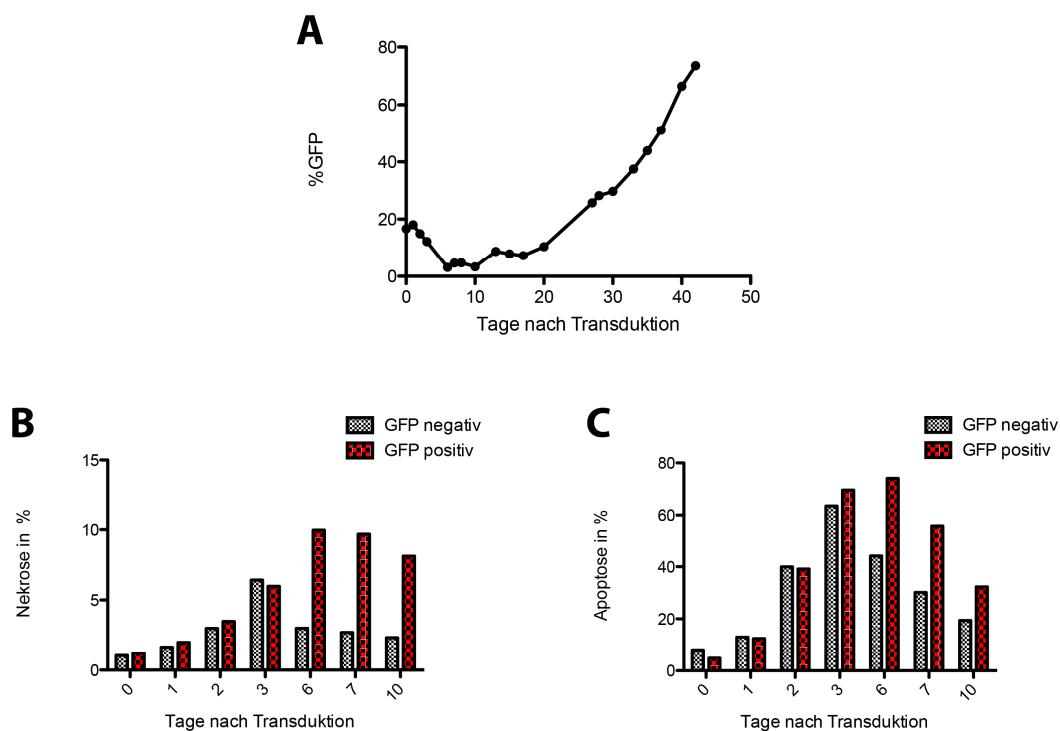


Abbildung 18 Apoptose Assay von NPM-ALK transduzierten CTLL2

A. CTLL2 transduziert mit dem Onkogen NPM-ALK zeigten wenige Tage nach Transduktion einen rapiden Abfall der GFP-positiven Zellpopulation mit anschließendem Anstieg. B. Der Anteil der nekrotischen CTLL2 zeigte sich in der GFP-positiven Population höher als in der GFP negativen Population. C. Selbiges war für die apoptotischen Zellen zu beobachten, ein deutlich höherer Anteil an GFP-positiven CTLL2 wiesen Apoptose auf als in der GFP negative Zellpopulation.

4.1.4 Ausbildung von zwei GFP-positiven Zellpopulationen

Eine weitere Beobachtung aus den CTLL2-Langzeitkulturen zeigte sich in der Kultur CTLL2-NPM/ALK-niedrig. Mit dem Anstieg der GFP-positiven Zellen bildeten sich in dieser Kultur zwei GFP-positive Zellpopulationen aus. Eine hohe und eine niedrige GFP-positive Zellpopulation (Abbildung 19A). In der Langzeitkultur CTLL2-NPM/ALK-hoch bildete sich mit steigender GFP Expression nur eine einzelne GFP positive Zellpopulation aus (Abbildung 19B).

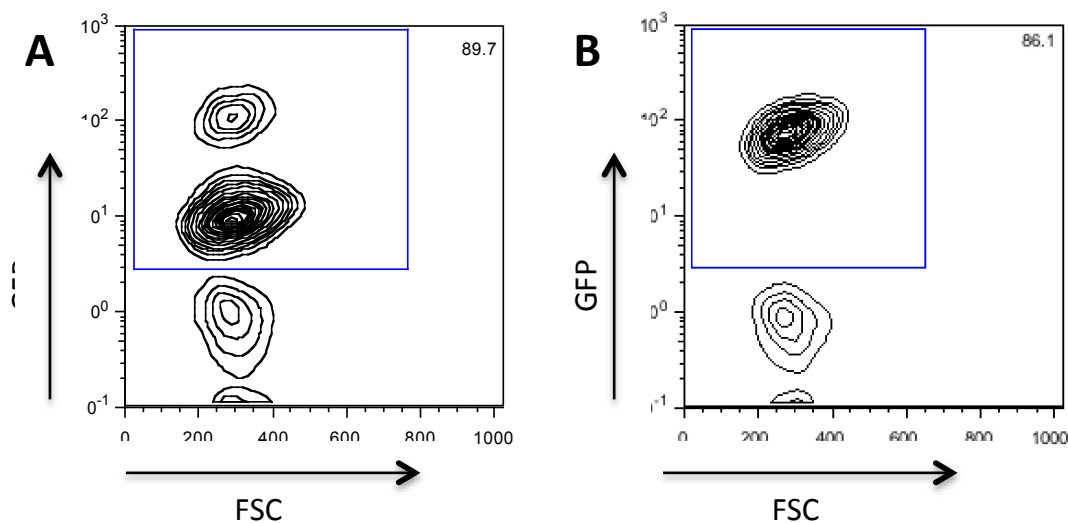


Abbildung 19 FACS Blots der CTLL2-Langzeitkulturen nach Anstieg der GFP Expression

A. In der CTLL2-NPM/ALK-niedrig Kultur bildeten sich mit Anstieg der GFP Expression eine hohe und eine niedrige GFP-positive Zellpopulation aus. B. Die CTLL2-NPM/ALK-hoch Kultur bildete eine GFP positive Population aus.

4.1.5 Expression von NPM-ALK in GFP-positiver Zellpopulation

Nachdem die CTLL2-Langzeitkulturen einer Zellsortierung auf die GFP positiven Zellpopulationen unterzogen wurden, galt es, die vier erhaltenen Kulturen auf die Expression von NPM-ALK zu untersuchen. Aus der Kultur CTLL2-NPM/ALK-niedrig wurden zwei Kulturen nach Zellsortierung angesetzt. Eine Kultur mit der hohen GFP positiven Zellpopulation (hohe GFP Population (NPM/ALK)) und eine mit der GFP niedrigen Zellpopulation (niedrige GFP Population (NPM/ALK)). Aus der Langzeitkultur CTLL2-NPM/ALK-hoch wurde die einzeln ausgewachsene GFP positive Zellpopulation (einzeln GFP Population (NPM/ALK)) sortiert. Als Kontrollzellen fungierten weiterhin die mit dem Kontrollvektor GFP transduzierten CTLL2

(CTLL2-GFP), welche ebenfalls auf die GFP positiven Zellen sortiert wurden. Nach intrazellulärer Färbung mit humanem NPM-ALK wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Onkogen/ NPM-ALK Expression untersucht. Der NPM-ALK Nachweis für Kontrollzellen fiel wie erwartet negativ aus. Interessanterweise war nicht in allen drei NPM-ALK transduzierten GFP positiven Zellpopulationen die Expression des Onkogens detektierbar. Die niedrige GFP Population (NPM/ALK) fiel in der FACS-Analyse negativ aus für die Expression von NPM-ALK (Abbildung 20B).

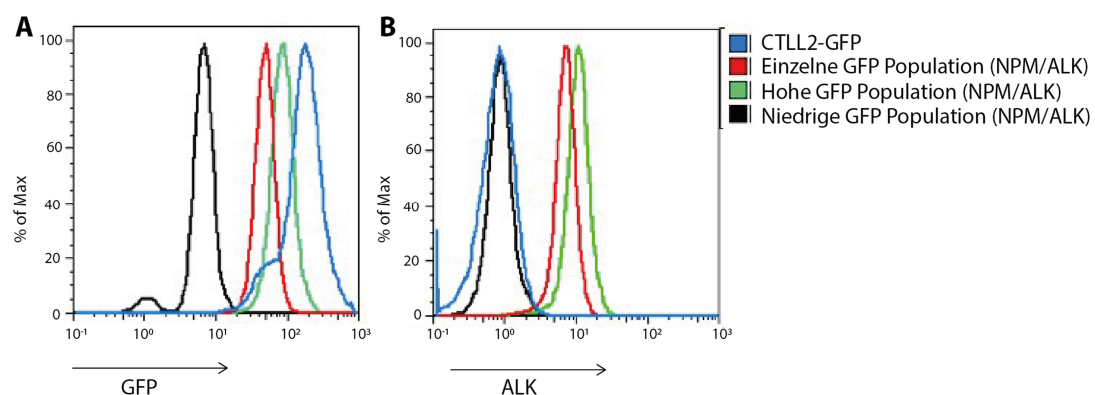
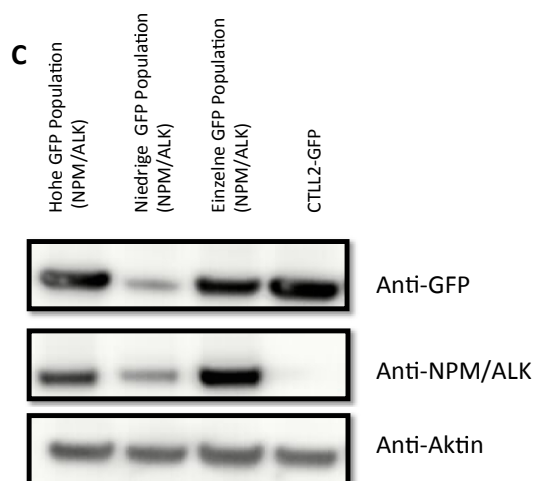


Abbildung 20 Onkogen Expression in transduzierten CTLL2 Populationen



Nach intrazellulärer Färbung mit humanem NPM-ALK konnte in der FACS Analyse in der niedrigen GFP Population (NPM/ALK) keine Onkogen Expression nachgewiesen werden. Die beiden anderen GFP Populationen (NPM/ALK) zeigten sich positiv und die GFP transduzierten Zellen wie erwartet negativ (B). Die Expression von GFP konnte in allen Zellen nachgewiesen werden, wenn auch in der niedrigen GFP Population (NPM/ALK) mit geringerer

Expressionsintensität als in den anderen Zellpopulationen (A). Zur Verifizierung der FACS-Analyse wurde die gleiche Anzahl GFP positiver Zellen für eine Western-Blot Analyse verwendet. Die Aktin Expression diente als Ladekontrolle. In allen NPM-ALK transduzierten CTLL2 Populationen konnte das Onkogen NPM-ALK nachgewiesen werden (C). Die Menge NPM/ALK und GFP war jedoch in der niedrigen GFP Population (NPM/ALK) deutlich geringer als in den beiden anderen NPM/ALK transduzierten Populationen.

Um auszuschließen, dass es sich um ein Sensitivitätsproblem handelt, wurde die GFP- und NPM-ALK Expression zusätzlich per Western Blot analysiert (Abbildung 20C).

Für die Western-Blot Analyse wurde die gleiche Anzahl GFP positiver Zellen verwendet. Um den Einsatz der gleichen Menge an Zellen zu demonstrieren, diente beta-Aktin als Ladekontrolle. Der Western-Blot konnte das Ergebnis der FACS- Analyse nicht bestätigen. In allen mit dem Onkogen transduzierten Zellpopulationen wurde GFP und NPM-ALK nachgewiesen. Jedoch zeigte die niedrige GFP Population (NPM/ALK) einen deutlich geringeren Anteil an GFP und NPM-ALK. Um weitere Sensitivitätsproblem bei der FACS-Analyse auszuschließen, wurden die weiteren durchflusszytometrischen Untersuchungen mit den Zellen der „hohen GFP Population (NPM/ALK)“ durchgeführt.

4.1.6 Markerexpression von NPM-ALK transduzierten CTLL2

Zur Erstellung eines Markerprofils wurde in den Zellen aus der hohen Population (NPM/ALK) (Abbildung 21B) und den Kontrollzellen CTLL2-GFP (Abbildung 21A) typische T-Zell Markern sowie durch NPM-ALK hochregulierte, charakteristische Marker nachgewiesen und mittels FACS analysiert.

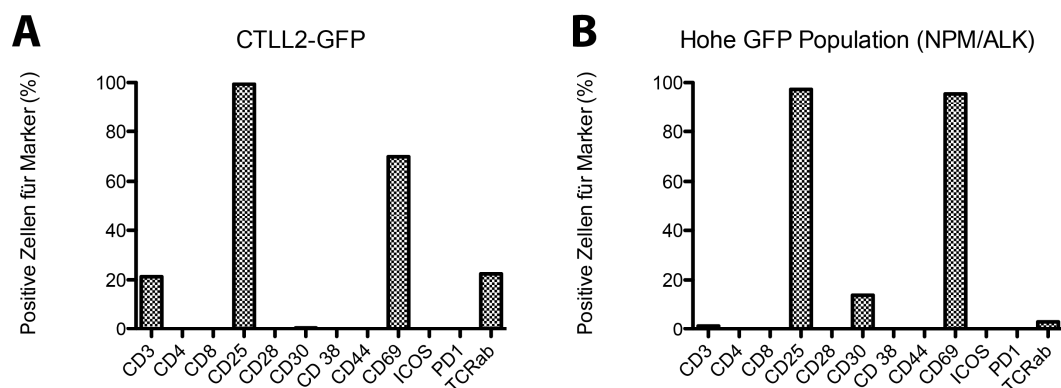


Abbildung 21 Mittelwerte der Markerprofile von CTLL2 Kontrollzellen und NPM-ALK transduzierter CTLL2

A. Im erstellten Markerprofil waren die Kontrollzellen CTLL2-GFP für die Oberflächenmarker CD3, CD25, CD69 und den TCR_{ab} positiv. B. Die NPM-ALK transduzierten CTLL2 zeigten eine deutlich geringere Expression für den Oberflächenmarker CD3 und den TCR_{ab}. CD25, CD30 und CD69 waren ebenfalls detektierbar. Die Färbung auf die Marker CD4, CD8, CD28, CD38, CD44, ICOS und PD1 fielen sowohl für die Kontrollzellen als auch für die NPM-ALK transduzierten CTLL2 negativ aus.

Alle Marker wurden um Zellzyklusabhängigkeiten zu vermeiden an drei aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Der Nachweis des T-Zell Markers CD3 und der Nachweis des T-Zellrezeptors (TCR_{ab}) fiel sowohl für die NPM-ALK transduzierten CTLL2 als auch für die Kontrollzellen positiv aus. Allerdings zeigten die Onkogen transduzierten CTLL2 einen deutlich geringeren Anteil an CD3 und TCR_{ab} positiven Zellen als die Kontrollzellen. Die Expression des IL2-Rezeptors konnte durch die CD25 Färbung (α -Kette des IL2 Rezeptors) sowohl in den Kontrollzellen als auch in den CTLL2-NPM/ALK Zellen nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde in den Kontrollzellen und in den NPM-ALK transduzierten Zellen der Aktivierungsmarker CD69 nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen wurde interessanterweise in den NPM-ALK transduzierten CTLL2 der Oberflächenmarker CD30 detektiert. CD4, CD8, CD28, CD38, CD44, ICOS und PD1 waren nicht detektierbar.

4.1.7 Aktivierung von NPM-ALK vermittelten Signalwegen in NPM-ALK transduzierten CTLL2

Die Bestimmung von Phosphoproteinen wurde genutzt, um die Aktivität von Signalmolekülen zu ermitteln, die in der NPM-ALK vermittelten Signalkaskade eine wichtige Rolle spielen. Hierzu wurden die NPM-ALK transduzierten CTLL2 einem Phosflow Protokoll unterzogen und in anschließender FACS Analyse die Phosphorylierung von STAT1, STAT3, STAT5, ERK1/2, und AKT(T308) untersucht. Die Onkogen transduzierten CTLL2 zeigten eine erhöhte Phosphorylierung für STAT1 (Abbildung 22A) und STAT3 (Abbildung 22B), im Gegensatz zu den GFP transduzierten Kontrollzellen. Für die Phosphorylierung von STAT5 (Abbildung 22C) konnte kein Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den NPM-ALK transduzierten CTLL2 festgestellt werden. Der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 (Abbildung 22D) und AKT(T308) (Abbildung 22E) war in den CTLL2-NPM/ALK Zellen ebenfalls deutlich höher als in den CTLL2-GFP Zellen.

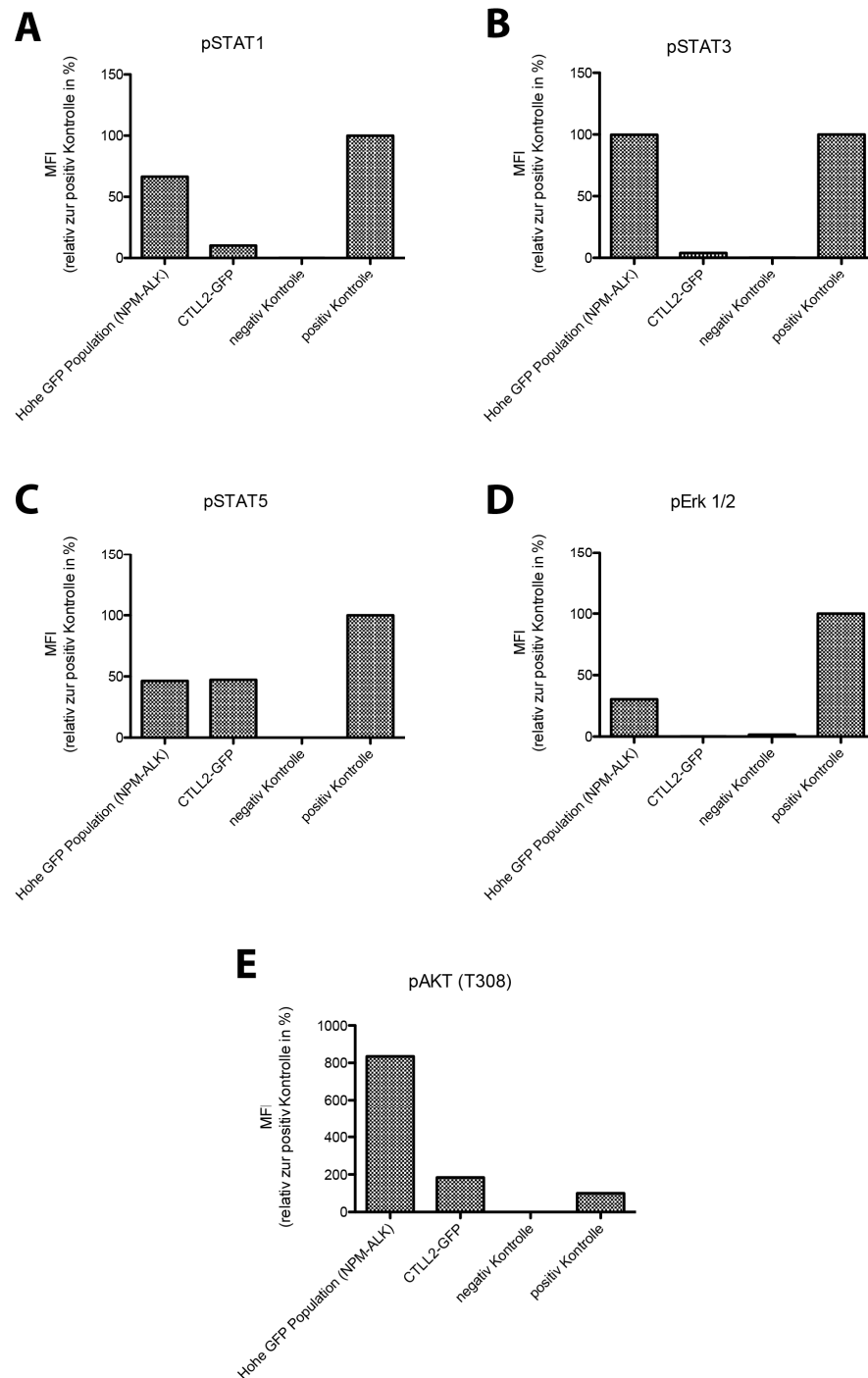


Abbildung 22 Protein Phosphorylierung in NPM-ALK transduzierten CTLL2

CTLL2 transduziert mit dem Onkogenvektor NPM-ALK oder dem Kontrollvektor GFP wurden analysiert auf die Phosphorylierung von STAT 1 (A), STAT3 (B), STAT5 (C), ERK1/2 (D) und AKT (T308) (E). Als Positivkontrolle wurden CTLL2, welche mit H_2O_2 behandelt wurden, verwendet. Als Negativkontrolle dienten CTLL2, die 24 Stunden vor dem Versuch serumfrei gehalten wurden.

4.2 Genexpression muriner T-Zellen nach Transduktion mit NPM-ALK

Eine vergleichende Genexpressionsanalyse wurde zwischen murinen, NPM-ALK transduzierten T-Zellen und GFP transduzierten murinen T-Zellen als Kontrollzellen durchgeführt. Die Analyse erfolgte insbesondere, um Unterschiede in der Expression apoptotischer Gene zu identifizieren. Die Analyse wurde durchgeführt mit einem Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array. Die Ergebnisse wurden gefiltert für alle Gene mit einem fold change unter 2 oder über 2.

Als Spendertiere für die murinen T-Zellen wurden Mäuse vom OT1- und P14-Stamm verwendet. Die isolierten T-Zellen wurden mit dem Onkogen NPM-ALK oder dem Kontrollgen GFP transduziert. Einen Tag nach Transduktion wurden die transduzierten T-Zellen sortiert und die Genexpressionsanalyse durchgeführt. Die beiden NPM-ALK transduzierten T-Zellen (OT1 und P14) zeigten eine große Überschneidung der Genexpression (Abbildung 23).

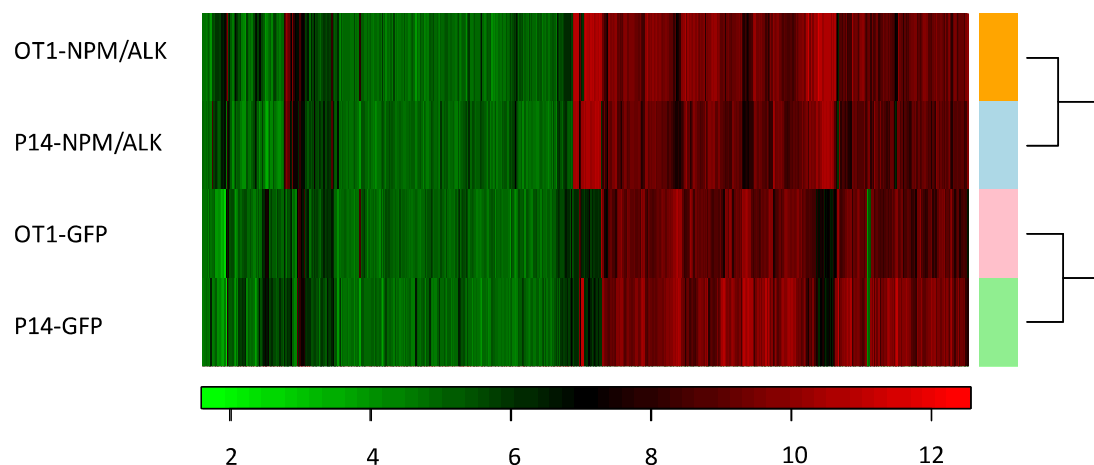


Abbildung 23 Gruppierte Hitzekarte (Heatmap) der Genexpression

Heatmap der Genexpression NPM-ALK transduzierter OT1- und P14- Zellen, sowie GFP transduzierter OT1- und P14-Zellen als Kontrollzellen. Die hierarchische Gruppierung als Dendogramm dargestellt, zeigte eine Clusterbildung der NPM-ALK transduzierten Zellen.

In den NPM-ALK transduzierten OT1-Zellen waren 377 Gene hochreguliert und 108 Gene herunterreguliert, verglichen mit den GFP transduzierten OT1-Zellen. In den NPM-ALK transduzierten P14-Zellen zeigten sich 186 Gene hoch- und 254 Gene runterreguliert im Vergleich zu den GFP transduzierten P14-Zellen. In der Gegenüberstellung mit den

Kontrollzellen zeigten die NPM-ALK transduzierten OT1-Zellen eine Hochregulierung von 18 Genen, welche mit apoptotischen Prozessen assoziiert werden. Für die NPM-ALK transduzierten P14-Zellen wurden 10 Apoptose assoziierte Gene detektiert, die hochreguliert waren, verglichen mit den Kontrollzellen. Die 10 hochregulierten Gene der P14-Zellen überschnitten sich mit den ermittelten aus den OT1-Zellen.

Tabelle 6 Liste hochregulierter Apoptose assoziierter Gene

OT1 (FC > 2)	P14 (FC >2)
IL6	IL6
Inhba	Inhba
Cd40lg	Cd40lg
Tnfrsf8	Tnfrsf8
Akt2	
Cycs	
Csrnp1	
Jak2	
Adora3	Adora3
Adam9	
Dusp6	Dusp6
Cfar	
Adarb1	Adarb1
Lif	
Gadd45g	Gadd45g
Smox	Smox
Stat5a	
Casp6	Casp6

Die Legende der entsprechenden Gene befindet sich im Anhang in Tabelle 18.

4.3 Murines Transplantationsmodell

Um TCR-abhängige Verteilungsmuster von NPM-ALK transduzierten TCR monoklonalen Spender T-Zellen (OT1, P14) zu untersuchen, wurden 5×10^6 Zellen transduzierte T-Zellen in Rag1- defiziente Empfängertiere transplantiert (Abbildung 24)

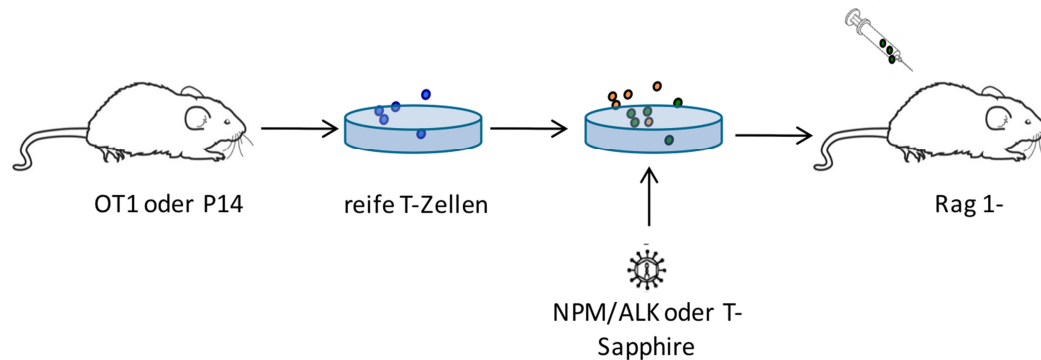


Abbildung 24 Vereinfachte Darstellung des verwendeten Mausmodells

A. OT1 –oder P14 Mäuse dienten als Spender für murine T-Zellen mit monoklonalem TCR. Die isolierten reifen T-Zellen wurden in Kultur genommen und stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mittels retroviraler Transduktion mit dem Onkogenvektor NPM/ALK oder dem Kontrollvektor T-Sapphire (beides gekoppelt an die Firefly-Luciferase) transduziert und in die Rag1-defizienten Empfängertiere transplantiert.

4.3.1 TCR-monoklonale Spenderzellen und Transduktionseffizienz

Als T-Zell Spender wurden Mäuse vom OT1-Stamm oder vom P14-Stamm verwendet. Die T-Zell Populationen dieser Mausstämmen zeichnen sich durch einen monoklonalen transgenen TCR aus, welcher jeweils ein spezifisches Peptid bindet. Für die OT1-Zellen ist das spezifische Peptid das OVA-Peptid und für die P14-Zellen das gp33-Peptid. Aufgrund des MHC-Kontexts besitzen diese Tiere fast ausschließlich zytotoxische T-Zellen (CD8) und nur einen geringen Anteil an T-Helferzellen (CD4).

Die aus Milz und Lymphknoten isolierten TCR-monoklonalen reifen Spender T-Zellen (OT1, P14) wurden in Kultur genommen und mit dem entsprechenden spezifischen Peptid (OT1/OVA-Peptid, P14/gp33-Peptid) stimuliert. Im Anschluss folgte eine zweifache Transduktion mit gammaretroviralen Vektorüberständen. Der verwendete Onkogenvektor enthielt NPM-ALK gekoppelt an die Firefly-Luciferase, der Kontrollvektor enthielt T-Sapphire ebenfalls gekoppelt an die Firefly-Luciferase.

Vor Transplantation der Zellen wurde der Erfolg der Transduktion mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Für die OT1 Zellen zeigte sich für die Kontrollvektor transduzierten Zellen eine Transduktionseffizienz von 82% (Abbildung 25B). Die Onkogenvektor transduzierten OT1 Zellen wiesen eine Transduktionseffizienz von knapp 12% auf (Abbildung 25A).

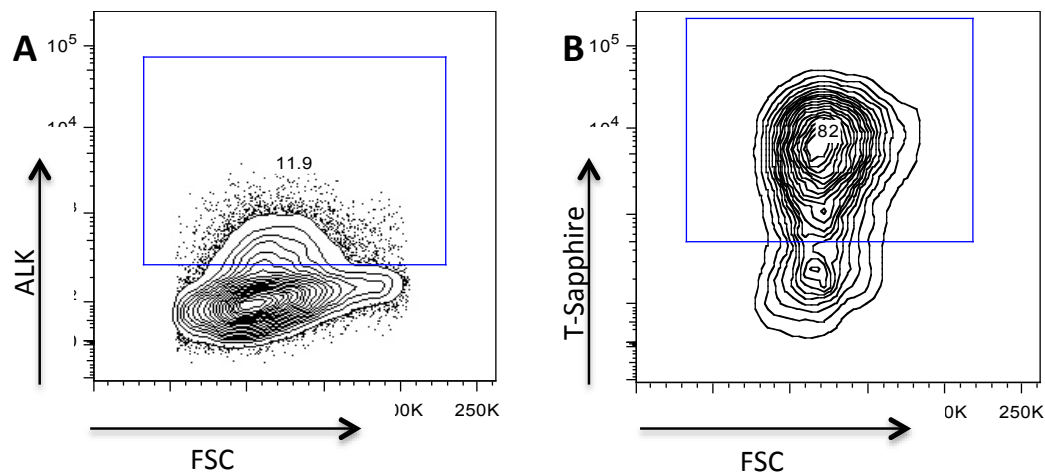


Abbildung 25 Transduktionseffizienzen transduzierter OT1 Zellen

OT1 Zellen nach doppelter Transduktion mit gammaretroviralen Vektoren

A. OT1 Zellen transduziert mit dem Onkogenvektor NPM/ALK-Luci zeigten eine Transduktionseffizienz von knapp 12% vor Transplantation B. Die Transduktionseffizienz der mit dem Kontrollvektor T-Sapphire-Luci transduzierten OT1 Zellen betrug 82% vor Transplantation.

Für die Kontroll- und Onkogenvektor transduzierten P14-Zellen wurde ebenfalls die Transduktionseffizienz vor Transplantation ermittelt. Für den Onkogenvektor wurden zwei Ansätze mit nahezu identischen Transduktionseffizienzen verwendet. Der eine Ansatz zeigte einen Anteil von 29,5% NPM-ALK positiver Zellen (Abbildung 26A), der andere Ansatz einen Anteil von 31,2% NPM-ALK positiver Zellen (Abbildung 26B). Die Transduktionseffizienzen für die Kontrollvektor transduzierten P14-Zellen lag bei 48,2% (Abbildung 26C).

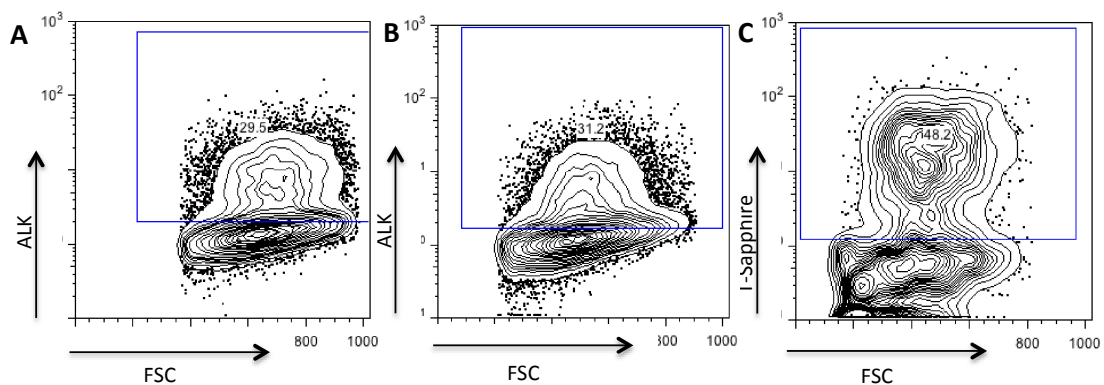


Abbildung 26 Transduktionseffizienzen transduzierter P14- Zellen

Transduktionseffizienzen nach zweifacher Transduktion mit gammaretroviralen Vektoren.

Die beiden Ansätze der P14 Zellen transduziert mit dem Onkogenvektor NPM/ALK-Luci zeigten nahezu identische Transduktionseffizienzen von 29,5% (A) und 31,2% (B). Die mit dem Kontrollvektor T-Sapphire-Luci transduzierte P14 Zellen waren zu 48,2% T-Sapphire positiv (C).

Die genmodifizierten Zellen wurden in Rag 1- defiziente Empfängertiere transplantiert (6-12 Tiere pro Vektor, je Zelltyp). Tabelle 7 zeigt eine genaue Übersicht über die Versuchstiergruppen.

Tabelle 7 Übersicht Versuchstiergruppen

Bezeichnung	Zelle	Vektor	Anzahl Tiere	Transduktionseffizienz
Kontrollgruppe OT1	OT1	T-Sapphire-Luci	12	82%
Kontrollgruppe P14	P14	T-Sapphire-Luci	10	48.2%
Onkogengruppe OT1	OT1	NPM/ALK-Luci	6	11.9%
Onkogengruppe P14	P14	NPM/ALK-Luci	8	29.5% -31.2%

4.3.2 Repopulation des T-Zelltransplantats im Blut der Empfängertiere

Vier Wochen nach Transplantation wurde die Repopulierung der Donorzellen in den Rag1-defizienten Empfängertieren untersucht. Hierzu wurden den Rezipienten Blut aus der Schwanzvene entnommen. Das Blut wurde mittels FACS Analyse auf den Donorzellmarker CD8, den T-Zellmarker CD3 sowie auf den T-Helferzellmarker CD4 untersucht. Da es sich bei den Empfängertieren um Rag1-Mäuse handelte, welche aufgrund des fehlenden Rag1-Gens nicht in der Lage sind, B- und T- Zellen zu entwickeln, entsprachen die im Blut zirkulierenden

Lymphozyten der transplantierten Zellpopulation. In allen Versuchstiergruppen konnten T-Lymphozyten nachgewiesen werden, jedoch zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen. In der OT-1 Kontrollgruppe wurde der höchste Anteil an CD3⁺ und CD8⁺ Zellen ermittelt (Abbildung 27A). Die P14-Kontrollgruppe (Abbildung 27B), die OT1-Onkogengruppe (Abbildung 27C) und die P14-Onkogengruppe (Abbildung 27D) zeigten einen niedrigeren Anteil an CD3⁺ und CD8⁺ Zellen.

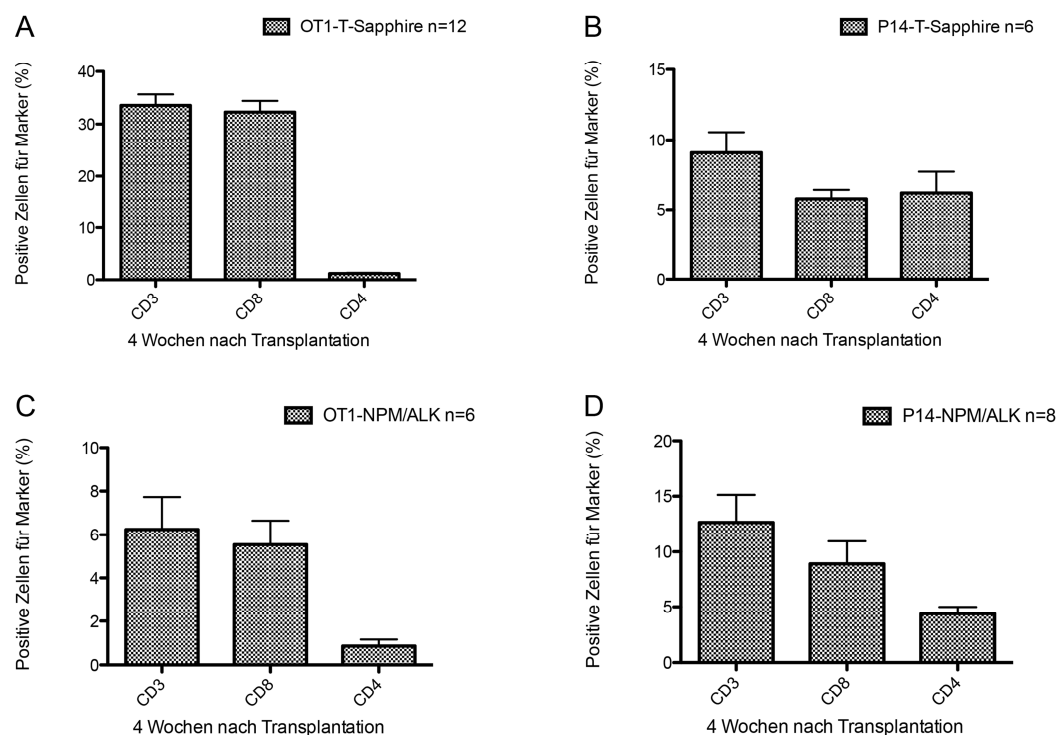


Abbildung 27 Blutanalyse T-Zell transplantiertter Rag1-Rezipienten

Gezeigt wird der prozentuale Anteil an CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Blut vier Wochen nach Transplantation der transduzierten OT1- oder P14-Zellen für die OT1-Kontrollgruppe (A), die P14-Kontrollgruppe (B), die OT1-Onkogengruppe (C) und die P14-Onkogengruppe (D).

4.3.2.1 Anteil transgener T-Zellen im Blut

Für die OT1- und P14-Kontrollgruppe konnte neben dem Nachweis des T-Zelltransplantats im Blut der Empfängertier (siehe Kapitel 4.3.2) auch der Anteil an genetisch modifizierten

Donorzellen im Blut ermittelt werden. Der Anteil der genetisch modifizierten Donorzellen ließ sich über das Transgen T-Sapphire in der FACS Analyse nachweisen. Hierfür wurde der Anteil an T-Sapphire positiven Zellen in der CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulation ermittelt (Abbildung 28).

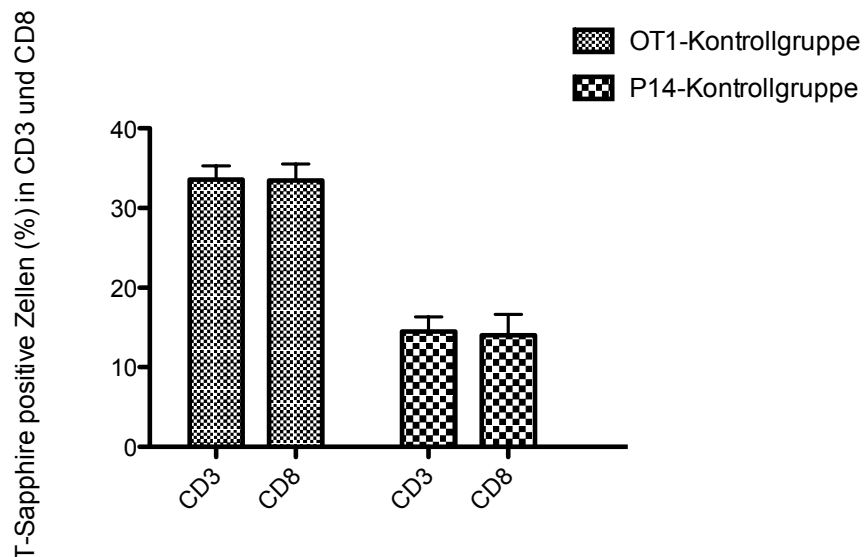


Abbildung 28 T-Sapphire Expression der peripheren T-Zellen in der OT1- und P14-Kontrollgruppe

Gezeigt ist der prozentuale Anteil an T-Sapphire in der CD3⁺ und CD8⁺ Zellpopulation für die OT1- und P14-Kontrollgruppe.

Der prozentuale Anteil an T-Sapphire positiven Zellen lag sowohl in der CD3⁺ Zellpopulation als auch in der CD8⁺ Zellpopulation, innerhalb der OT1-Kontrollgruppe, bei in etwa 35%. In der P14-Kontrollgruppe fiel der Anteil an T-Sapphire positiven Zellen in den CD3⁺ und CD8⁺ Zellpopulationen mit etwa 15% niedriger aus. Die Ermittlung von NPM-ALK positiven T-Zellen im Blut für die Onkogengruppen ist mittels FACS Analyse nicht möglich, da hierzu eine intrazelluläre Detektion erforderlich gewesen wäre.

4.4 In-vivo-Visualisierung der transgenen T-Zellen mittels Biolumineszenz

Um mögliche Verteilungsmuster, der mit NPM/ALK transduzierten TCR transgenen T-Zellen, im Verlauf der Lymphomagenese in-vivo erkennen zu können, wurden Biolumineszenz (BLI)-Messungen der Versuchstiere durchgeführt. Ebenso diente das BLI der Beurteilung von

Repopulierung und Anreicherung der gentechnisch veränderten Zellen. Um die transduzierten Zellen mittels BLI detektieren zu können, wiesen alle verwendeten gammaretroviralen Vektoren das Gen für die Firefly-Luciferase auf (Tabelle 3). Durch die BLI ist es möglich, die transplantierten Zellen in-vivo über einen Zeitraum verfolgen zu können.

4.4.1 Zeitlicher Ablauf der BLI-Messungen

In wöchentlichen Intervallen wurden die Empfängertiere nach Transplantation einer in-vivo-Biolumineszenzmessung unterzogen (Abbildung 29)

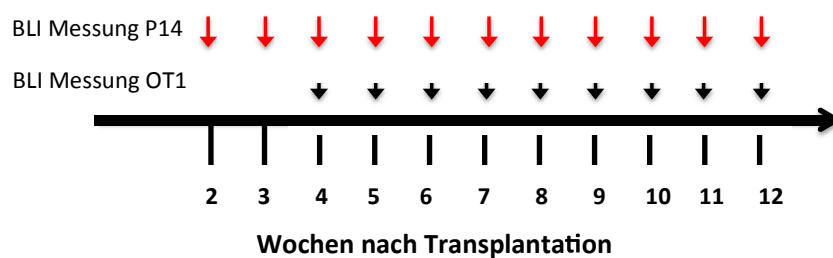


Abbildung 29 Zeitlicher Verlauf der BLI Messung

In allen Versuchstiergruppen wurde eine wöchentliche BLI Messung durchgeführt.

Die P14-Gruppen wurden erstmals 2 Wochen nach Transplantation auf biolumineszente Strahlung gemessen (rote Pfeile). In den OT1-Gruppen wurde vier Wochen nach Transplantation mit der Biolumineszenzmessung begonnen (schwarze Pfeile).

Vor der ersten BLI-Messung wurde eine Nullmessung mit nicht transplantierten Rag1-defizienten Mäusen durchgeführt. Zur Auswertung der entstandenen BLI Aufnahmen wurde die Software Living Image 4.0 (Perkin Elmer) verwendet. Durch das Setzen sogenannter ROI (Region of interest) konnte ermittelt werden, wie hoch die Strahlungsdichte der biolumineszenten Strahlung innerhalb der Fläche des gesetzten ROIs war. Im Zuge der Auswertung wurden alle Versuchstiere zunächst im Ganzkörper-ROI in der ventrodorsalen Aufnahme betrachtet (Abbildung 30).

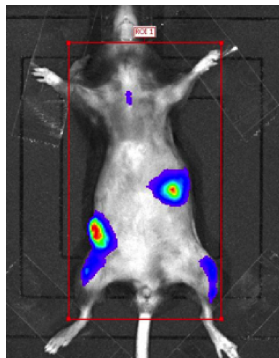


Abbildung 30 Ganzkörper-ROI in der ventrodorsalen BLI-Aufnahme

Durch das Setzen von ROIs wird die Strahlungsdichte der biolumineszenten Strahlung innerhalb einer begrenzten Fläche gemessen. In der Abbildung ist ein Ganzkörper ROI (rotes Quadrat) in der ventrodorsalen BLI-Aufnahme zu erkennen. Der Ganzkörper ROI diente zur allgemeinen Beurteilung, ob ein biolumineszentes Signal zu verzeichnen war.

Die Nullmessung für den ventrodorsalen Ganzkörper-ROI ergab ein Hintergrundsignal von $158 \text{ p/s/cm}^2/\text{sr}$. Dieses Hintergrundsignal wurde als Grenzwert für biolumineszente Strahlung festgelegt.

Stellte man die Mittelwerte der biolumineszenten Strahlung der Versuchstiergruppen im ventrodorsalen Ganzkörper-ROI der Nullmessung gegenüber, konnte in den verschiedenen Versuchstiergruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erstmals ein biolumineszentes Signal gemessen werden (Abbildung 31).

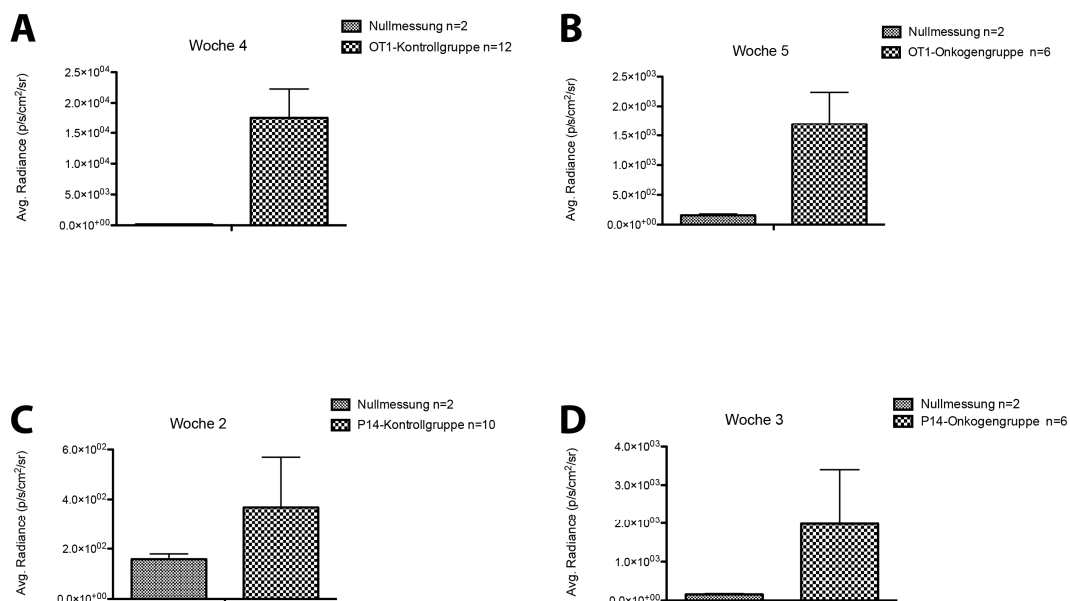


Abbildung 31 Mittelwerte der biolumineszenten Strahlung gegenüber der Nullmessung

Gezeigt sind die Mittelwerte der biolumineszenten Strahlung im ventrodorsalen Ganzkörper-ROI gegenüber der Nullmessung. In den vier Versuchstiergruppen zeigte sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten erstmals ein biolumineszentes Signal.

Für die OT1 transplantierten Mäuse wurde ein biolumineszentes Signal für die Kontrollgruppe in Woche 4 (Abbildung 31A) und für die Onkogengruppe (Abbildung 31B) in Woche 5 nach Transplantation nachgewiesen. In den P14 transplantierten Mäusen zeigte sich eine erste biolumineszente Strahlung zwei Wochen nach Transplantation in der Kontrollgruppe (Abbildung 31C). Eine Woche später, in der dritten Wochen nach Transplantation, konnte erstmals in der P14-Onkogengruppe biolumineszente Strahlung nachgewiesen werden (Abbildung 31D).

Mit dem Auftreten der biolumineszenten Strahlung konnte, neben der Blutanalyse mittels FACS, auch in der BLI-Messung eine erfolgreiche Anreicherung und die Repopulierung der transgenen Zellen in den Versuchstieren nachgewiesen werden.

4.4.2 Steigende biolumineszente Signale können mit der Entstehung eines Tumors assoziiert werden

In Abbildung 31 wurde gezeigt, dass in allen Versuchstiergruppen ein biolumineszentes Signal nachgewiesen werden konnte. Verfolgte man dieses Signal nach Erstauftreten im Ganzkörper-ROI in den weiteren wöchentlichen BLI-Messungen, zeigte sich, dass die Strahlungsdichte der biolumineszenten Strahlung sowohl in der OT1-Kontrollgruppe (Abbildung 32A) als auch in der P14-Kontrollgruppe (Abbildung 32B) über den gesamten Versuchsverlauf nahezu konstant blieb. Im Gegensatz zu den Kontrollgruppen wurden über den zeitlichen Verlauf in der Einzeltierbetrachtung der OT1-Onkogengruppe (Abbildung 32A) und der P14-Onkogengruppe (Abbildung 32B) starke Schwankungen des biolumineszenten Signals detektiert. Neben diesen Schwankungen des Signals war zu beobachten, dass die Strahlungsdichte der Einzeltiere in der OT1-Onkogengruppe und der P14-Onkogengruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten rapide anstieg und die Strahlungsdichte der Kontrollgruppen um ein Vielfaches überschritt. Dieser Anstieg des biolumineszenten Signals konnte mit dem Auftreten eines klinisch manifesten Tumors in Verbindung gebracht werden.

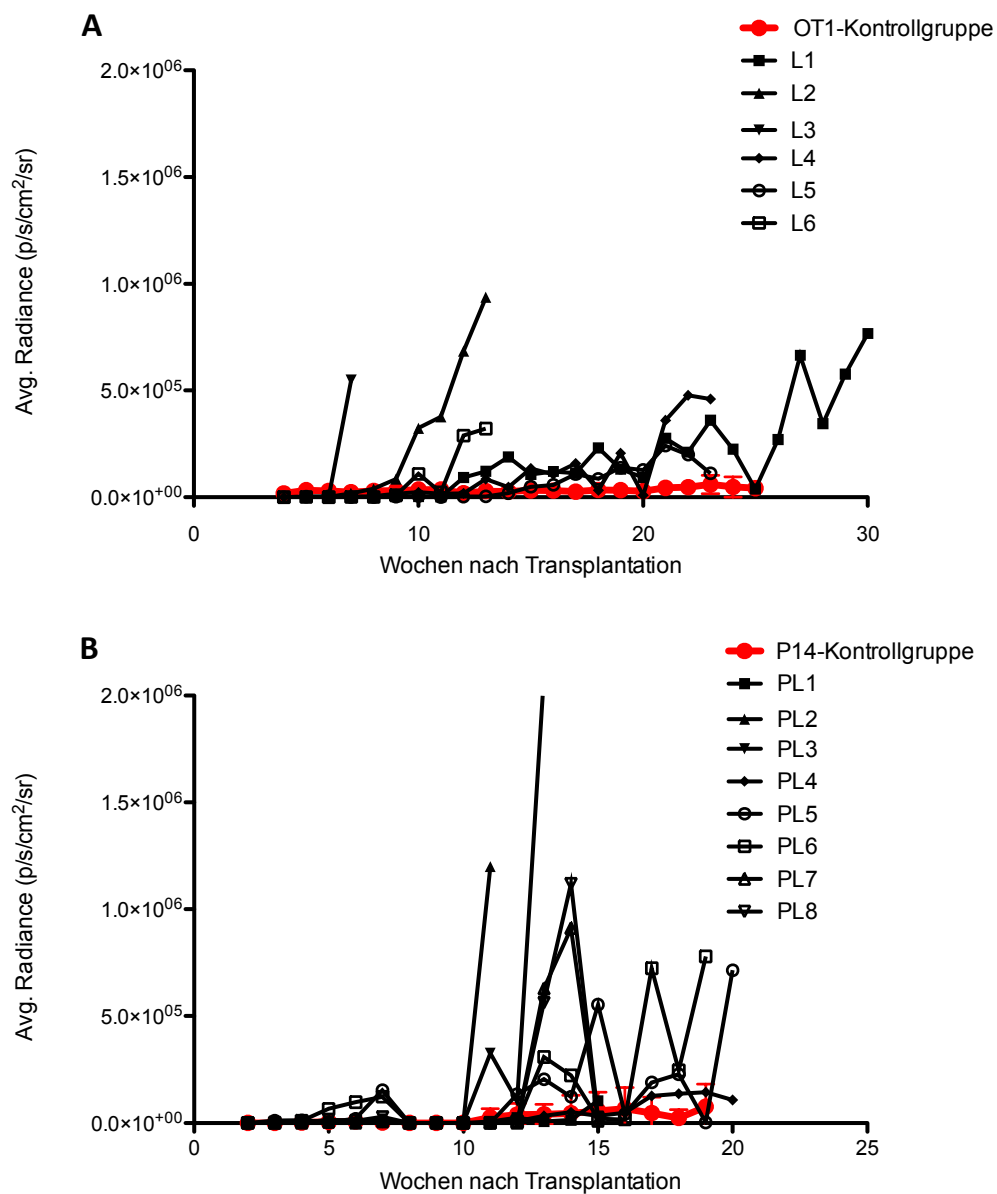


Abbildung 32 BLI Ganzkörpermessungen der OT1- und P14-Kontrollgruppe und der Einzeltiere der OT1- und P14-Onkogengruppe

Gezeigt wird die biolumineszente Strahlungsdichte im ventrodorsalen Ganzkörper ROI über den gesamten Verlauf des Versuches. Die Daten der OT1-Kontrollgruppe (n=12) und der P14-Kontrollgruppe (n=10) wurden im Mittelwert aufgetragen. Die Versuchstiere aus der OT1-Onkogengruppe (L1-L6) und P14-Onkogengruppe (PL1-PL8) wurden einzeln erfasst. Während in den Kontrollgruppen über den gesamten Versuch nur geringe Schwankungen im BLI-Signal zu verzeichnen waren, zeigten die BLI-Messungen der OT1-Onkogengruppe und P14-Onkogengruppe starke Schwankungen des Signals.

4.4.3 NPM-ALK transduzierte T-Zellen mit monoklonalem TCR zeigen keine gleichen Verteilungsmuster in der BLI

Zur weiteren Beurteilung der Repopulationsdynamik der transplantierten T-Zellen und um mögliche TCR-spezifische Verteilungsmuster der mit NPM-ALK transduzierten T-Zellen erkennen zu können, wurden die BLI-Aufnahmen noch detaillierter ausgewertet. Hierzu wurden weitere, kleinere ROIs gesetzt, um die Strahlungsdichte bestimmter Regionen gezielter ermitteln zu können. Bei diesen kleineren Regionen handelt sich um Regionen, welche mit lymphatischen Organen assoziiert sind. In der ventrodorsalen BLI-Aufnahme wurden Einzel-ROIs auf den cervicalen Bereich, jeweils beidseits axial, inguinal und popliteal, sowie abdominal gesetzt (Abbildung 33A). In der laterolateralen Aufnahme wurde ein Ganzkörper-ROI (Abbildung 33B) gesetzt und ein ROI auf den splenalen Bereich (Abbildung 33C).

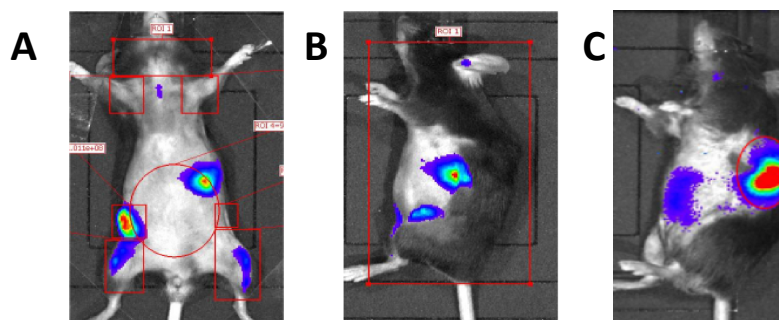


Abbildung 33 Einteilung der ROIs

A. Einzel-ROIs in der ventrodorsalen Aufnahme (cervical, axial, abdominal, inguinal, popliteal) B. Ganzkörper-ROI in der laterolateralen Aufnahme C. Milz-ROI in der laterolateralen Aufnahme
Gemessen wird jeweils nur die Strahlungsdichte der biolumineszenten Strahlung innerhalb der Fläche des ROIs (rotes Quadrat oder rote Ellipse).

Die erhobenen Daten wurden normalisiert und sowohl für die Kontrollgruppen als auch für die Onkogengruppen in einem Radialplot angeordnet, um mögliche Überschneidungen besser verdeutlichen zu können (Abbildung 34). Die Legende der einzelnen Regionen ist in Tabelle 8 hinterlegt.

Tabelle 8 Legende ROI Regionen

Region1	Region2	Region3	Region4	Region5	Region6	Region7	Region8
Cervical	Axial, re	Axial, li	Mesenterial	Inguinal, re	Inguinal, li	Popliteal, re	Popliteal, li

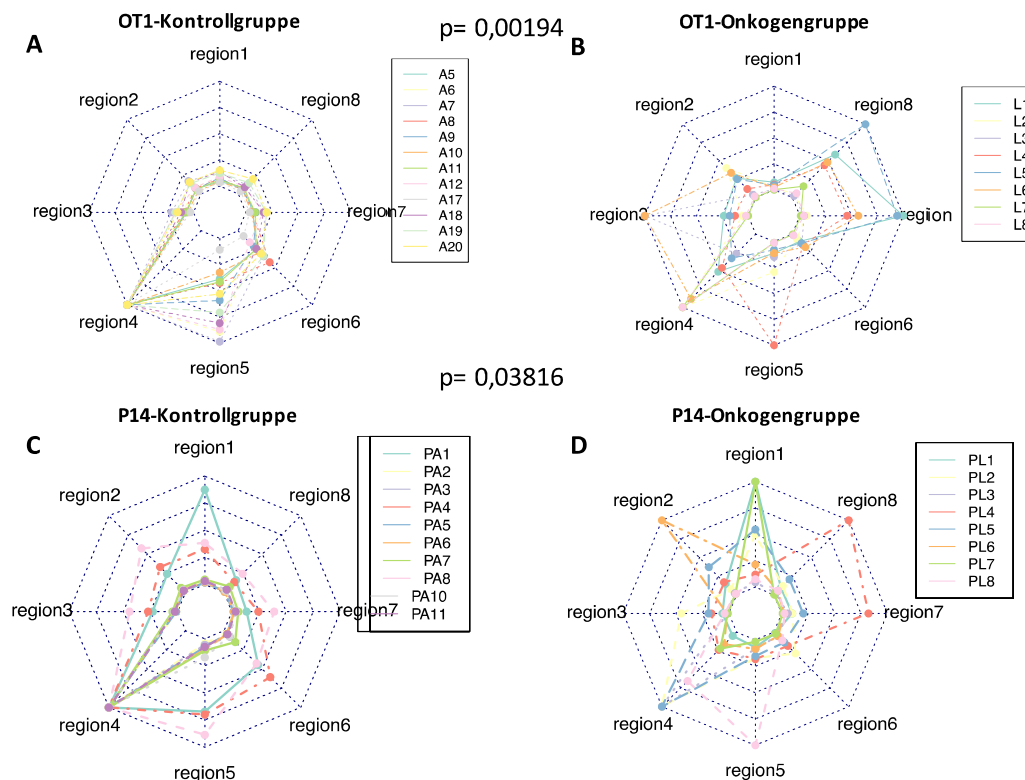


Abbildung 34 Einzel-ROI Auswertung im Netzdiagramm

Auswertungen im Netzdiagramm der Einzel-ROIs aus den Biolumineszenzmessungen für die OT1-Kontrollgruppe (A), die OT1-Onkogengruppe (B), die P14-Kontrollgruppe (C) und die P14-Onkogengruppe (D). Der p-Wert gibt den Signifikanzwert zwischen den Kontroll- und Onkogengruppen an.

In der Einzel-ROI Auswertung der OT1-Kontrollgruppe (Abbildung 34A) zeigte sich, dass sich die biolumineszierenden Zellen in fast allen Empfängertieren im mesenterialen Bereich aufhielten und dort das BLI-Signal am höchsten war. In nur wenigen Empfängertieren konnte ein schwächeres BLI-Signal im inguinalen Bereich detektiert werden. Exemplarisch ist in Abbildung 35A die BLI Aufnahmen einer Kontrollmaus aus der OT1-Kontrollgruppe dargestellt. Auch die Auswertung der P14-Kontrollgruppe (Abbildung 34C) zeigte eine

ähnliche Verteilung der biolumineszenten Zellen. In nahezu allen P14-Kontrolltieren zeigten sich die T-Zellen im mesenterialen Bereich. Schwächere BLI-Signale konnten im inguinalen und cervicalen Bereich ermittelt werden. In Abbildung 35B ist die BLI-Aufnahme eines P14-Kontrolltieres abgebildet.

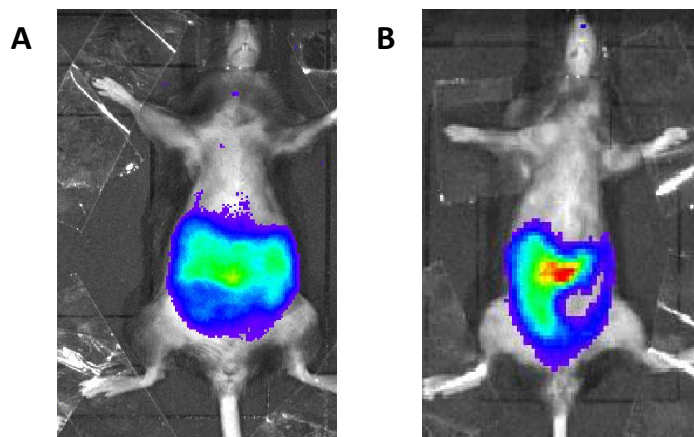


Abbildung 35 BLI Aufnahmen einer Kontrollmaus aus der OT1- und der P14-Kontrollgruppe

BLI-Aufnahme einer OT1-Kontrollmaus (A) und einer P14-Kontrollmaus (B) mit typischer Ansiedlung der biolumineszenten Zellen im Bereich des Abdomens.

In die ROI-Einzelauswertung der OT1-Onkogengruppe wurden zwei weitere Empfängertiere mit aufgenommen. Bei diesen beiden Empfängertieren handelt es sich um die Tiere aus den Etablierungsarbeiten der BLI-Messungen (Dissertation Stemann). Die beiden Empfängertiere wurden unter den gleichen Bedingungen BLI gemessen und ausgewertet wie die Tiere aus der vorliegenden Dissertation. Durch die Einbeziehung der beiden Mäuse aus der Etablierungsarbeit konnte eine erhöhte Fallzahl generiert werden, für die Untersuchung auf stimulatorische Nischen, ohne noch weitere Mäuse für das Experiment zu nutzen (Tierschutz). Somit wurden in dieser Gruppe insgesamt acht Onkogen transplantierte Mäuse in der ROI-Einzelauswertung betrachtet. Während sich in nahezu allen Versuchstieren der OT1-Kontrollgruppe die T-Zellen im mesenterialen Bereich aufhielten, war dies in der OT1-Onkogengruppe (Abbildung 34B) nicht der Fall. Viel mehr zeigte sich, dass die Individuen der OT1-Onkogengruppe ein BLI-Signal in unterschiedlichen lymphatischen Regionen aufwiesen. BLI-Signale der NPM-ALK transduzierten OT1-Zellen wurden in den Empfängertieren vor

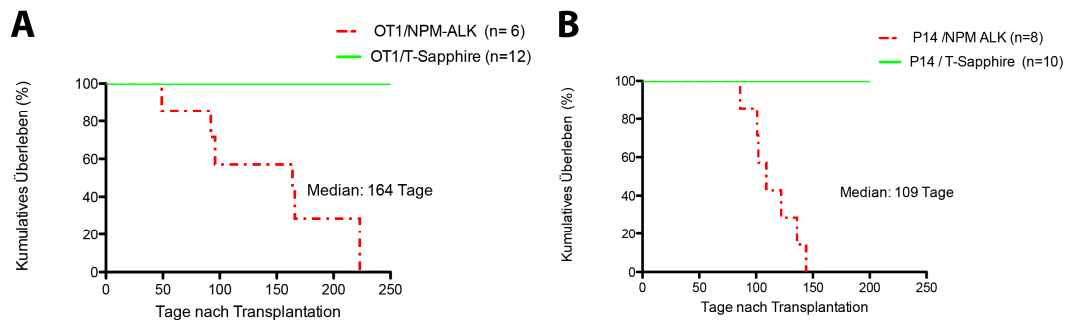


Abbildung 37 Kumulatives Überleben der Versuchstiergruppen

Rag1 defiziente Empfängertiere, welche mit TCR monoklonalen, NPM-ALK transduzierten OT1 Zellen (A) oder P14 Zellen (B) transplantiert wurden, bildeten nach einer Latenzperiode maligne Lymphome aus (rote Linie). Die Empfängertiere aus den Kontrollgruppen zeigten über den gesamten Versuchsverlauf keinerlei Tumore (grüne Linie).

Tiere, welche in der BLI und nach Palpation einen klinisch manifesten Tumoren zeigten, wurden euthanasiert und obduziert. In der Obduktion wurden alle erkennbaren pathologischen Veränderungen dokumentiert. Nahezu alle Tiere zeigten vergrößerte Lymphknoten oder eine Splenomegalie.

Die Obduktionsergebnisse der Tiere wurden mit den BLI-Daten bezüglich der Lokalisation der entstandenen Tumoren abgeglichen (Tabelle 9). Beispielhaft ist in Abbildung 38 die letzte BLI Aufnahme in der Einzel-ROI Auswertung einer Onkogenmaus aus der OT1-Onkogengruppe und der entfernte Tumor sowie die entfernte Milz dargestellt.

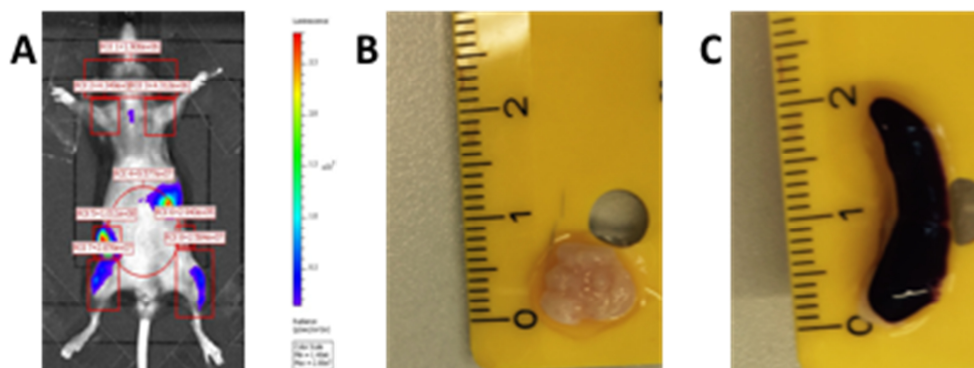


Abbildung 38 Einzel-ROI Auswertung und entnommene veränderte Organe

In der ventrodorsalen Einzel-ROI Auswertung (A) konnte im rechten inguinalen Bereich das höchste BLI-Signal ermittelt werden. Bei der Obduktion des Tiers zeigte sich der rechte inguinale Lymphknoten circa erbsengroß (B). Die entnommene Milz zeigte sich vergrößert (C).

Im Abgleich der Obduktionsergebnisse mit den BLI-Daten korrelierte bei nahezu allen Onkogentieren die Lokalisation des Tumors mit der Lokalisation des stärksten biolumineszenten Signals. So zeigte sich in der Obduktion der Tiere der OT1-Onkogengruppe, dass vier von fünf Tieren ein Lymphom in der Region mit der höchsten biolumineszenten Strahlungsdichte ausgebildet hatten. In der P14-Onkogengruppe zeigten sechs von sieben Tieren eine Übereinstimmung des BLI-Signals und der Tumorlokalisation. Die Daten der Tumorlokalisation und der Lokalisation des höchsten BLI-Signals in der jeweils letzten wöchentlichen BLI-Messung sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9 Tumorlokalisation und höchstes BLI Signal

Tiernummer	Ziellinie	Tumorlokalisation	Lokalisation des höchsten BLI-Signals
L1	OT1	Milz	Milz
L2	OT1	Lnn. mestenterialis	mesenterial
L3	OT1	Ln. axial links	axial links
L4	OT1	Ln. inguinal rechts	inguinal rechts
L5	OT1	n.a.*	n.a.
L6	OT1	Ln. axial links/Milz	Milz
PL1	P14	Ln. cervical	cervical
PL2	P14	n.a.*	n.a.*
PL3	P14	Ln. mesenterial + Leber	mesenterial
PL4	P14	Ln. mesenterial	mesenterial
PL5	P14	Milz	mesenterial
PL6	P14	Ln. cervical, Ln.axial rechts	axial rechts
PL7	P14	Ln. mesterial, Ln. cervical, Ln. axial links	mesenterial
PL8	P14	Ln. mesenterial + Leber	mesenterial
*n.a., nicht auswertbar Tier ist vor der Analyse verstorben			

Neben der makroskopischen Beurteilung wurden alle entfernten Lymphome und Organe durchflusszytometrisch und histopathologisch untersucht. In der Durchflusszytometrie wurde die Expression von NPM-ALK und die Expression von charakteristischen Tumormarkern des ALK+ALCLs analysiert. In allen fünf entfernten Tumoren aus der OT1-Onkogengruppe konnte NPM-ALK nachgewiesen werden und drei von fünf Tumoren zeigten die charakteristischen Tumormarker CD30 und ICOS. In der P14-Onkogengruppe konnte in allen sieben analysierten Tumoren die Expression von NPM-ALK, CD30 und ICOS nachgewiesen werden (Tabelle 10).

Tabelle 10 Expression von NPM-ALK und Tumormarkern (CD30 und ICOS) in entfernten Lymphomen

Onkogengruppe	NPM-ALK*	CD30*	ICOS*
OT1-Onkogengruppe n= 5 (6)^	5/5	3/5	3/5
P14-Onkogengruppe n=8 (7)^	7/7	7/7	7/7
*bestimmt im Live Gate, ^ein Tier ist vor der Analyse verstorben			

In der histopathologischen Untersuchung zeigten sich die Tumorzellen der NPM-ALK induzierten Lymphome meist als mittelgroße, zytoplasmaarme, monomorphe Zellen. Der zentral gelegene Zellkern war rund und kleine Kernkörperchen waren zu erkennen (Abbildung 39A). Die in allen morphologischen Varianten des humanen ALK⁺ALCL auftretenden Hallmark-Zellen konnten ebenfalls in den ALK induzierten Lymphomen der Mäuse detektiert werden (Abbildung 39B). Um die durchflusszytometrische Untersuchung der Tumoren auf die Expression von NPM-ALK zusätzlich zu verifizieren, wurde eine Immunhistochemie zum Nachweis von NPM-ALK durchgeführt. In allen untersuchten Lymphomen konnte das Onkogen NPM-ALK nachgewiesen werden (Abbildung 39C).

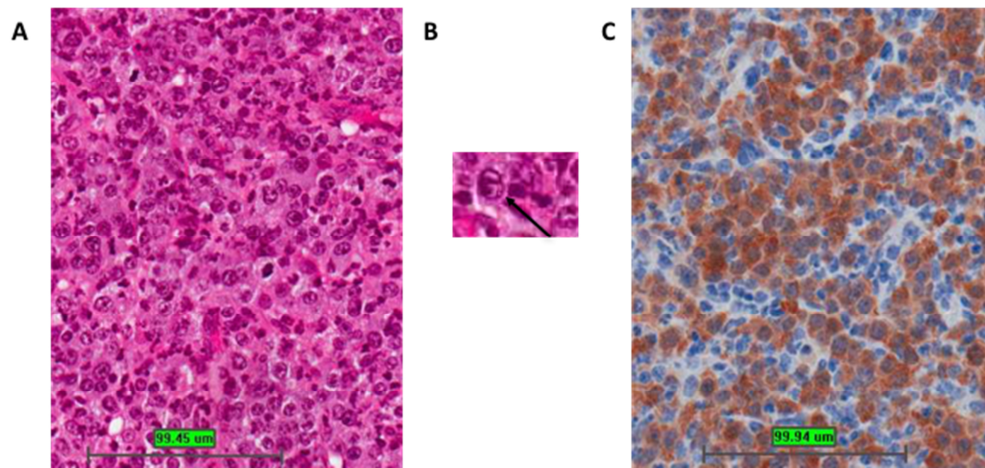


Abbildung 39 Histologie eines NPM-ALK induzierten Lymphoms in der Maus

A. Histologie eines ALK positiven Lymphoms der Maus (HE Färbung). B. Hallmark Zelle mit charakteristischem nierenförmigen Zellkern. C. INachweis von NPM-ALK mittels Immunhistochemie.

5 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurde der Effekt des Onkogens NPM-ALK, welches mittels retroviralem Gentransfer in die zytotoxische T-Zelllinie CTLL2 eingebracht wurde, analysiert und Veränderungen der Genexpression im Hinblick auf die Expression apoptotischer Gene in murinen NPM-ALK transduzierten T-Zellen untersucht (siehe Kapitel 5.1). Des Weiteren wurde in einem murinen Transplantationsmodell zwei verschiedene TCR transgene NPM-ALK transduzierte T-Zellpopulationen auf mögliche TCR-abhängige Verteilungsmuster in der in-vivo-Biolumineszenzmessung untersucht (siehe Kapitel 5.2). Die NPM-ALK induzierten Lymphome aus dem Mausmodell wurden im Anschluss analysiert und Parallelen zum humanen ALK⁺ ALCL gezogen (siehe Kapitel 5.3) und mögliche Einschränkungen des Mausmodells diskutiert (siehe Kapitel 5.4)

5.1 Einfluss der NPM-ALK Überexpression auf murine T-Zellen

Primäre murine T-Zellen, welche aus frischem Gewebe isoliert werden, besitzen unter Kulturbedingungen nur eine begrenzte Lebenszeit. Um den Effekt des Fusionsonkogens NPM-ALK auf murine T-Zellen über einen längeren Zeitraum zu untersuchen wurde deshalb in dieser Dissertation die zytotoxische T-Zelllinie CTLL2 eingesetzt. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine IL2-abhängige Zelllinie, wodurch Onkogeneffekte besser detektiert werden als in einer voll transformierten Zelllinie. Das Onkogen NPM-ALK wurde mittels retroviralem Gentransfer in die Zelllinie eingebracht. Unabhängig von der Höhe der Transduktionseffizienz der CTLL2 konnten wenige Tage nach der Transduktion nahezu keine transduzierten Zellen mehr in der FACS-Analyse (Abbildung 17) nachgewiesen werden. Nach unterschiedlich langen Perioden, in denen beinahe keine transduzierten CTLL2 in den angesetzten Kulturen detektierbar waren, kam es plötzlich zu einem rapiden Anstieg der transduzierten Zellen (Abbildung 17). Im durchgeführten Apoptose Assay konnte gezeigt werden, dass die Transduktion des Onkogens NPM-ALK in die zytotoxische T-Zelllinie wenige Tage nach Transduktion zur Apoptose und Nekrose der transduzierten Zellen führte (Abbildung 18). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit kürzlich veröffentlichten Studien. So zeigte sich in NPM-ALK angetriebenen ALCL-Zelllinien wie Karpas299 (163), SU-DHL1 (164,165) und SUP-M2 (166) im Anschluss an die Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren, dass die darauffolgende erhöhte Expression von NPM-ALK zur Apoptose der Zellen führt

(167). Ebenso zeigen NPM-ALK angetriebene ALCL-Zelllinien, welche zunächst mit einem TetON Lentivirus und anschließend mit NPM-ALK transduziert wurden, nach einer Doxycyclin induzierten Überexpression von NPM-ALK eine erhöhte Apoptoserate und die Aktivierung von Caspase 3 und 7, 48-72 Stunden nach Doxycyclin Gabe (168). In der gleichen Studie wurden ALCL-Zelllinien in NOD-SCID (nonobese diabetic/severe-combined immunodeficiency) Mäuse subkutan implantiert. Auch in diesem in-vivo-Xenograft-Modell bildeten sich durch die Überexpression von NPM-ALK keine Tumore aus (168). Die für diese Arbeit erhobenen Daten der Genexpressionsanalysen (Tabelle 6), NPM-ALK transduzierter muriner T-Zellen, zeigten ebenfalls eine Hochregulierung mehrerer Apoptose assoziierter Gene. Man könnte somit davon ausgehen, dass sich primäre T-Zellen nach der Transduktion mit NPM-ALK ähnlich verhalten wie transduzierte Zelllinien und die Zellen durch die Expression von NPM-ALK in Apoptose gehen. Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass es sich bei den erhobenen Genexpressionsdaten um Einzelproben handelte. Um die Daten zu verifizieren, sollte für zukünftige Arbeiten mit Duplikaten, besser noch Triplikaten gearbeitet werden.

Nachdem der Großteil der NPM-ALK transduzierten CTLL2 in Apoptose gingen, kam es nach Wochen, in welchen nahezu keine transduzierten Zellen ermittelt werden konnten, zur starken Expansion der verbliebenen transduzierten Zellen (Abbildung 17). Weshalb ein Teil der transduzierten Zellen nicht in Apoptose ging wurde nicht weitergehend untersucht. Ein möglicher Erklärungsansatz besteht darin, dass das Onkogen an einer Stelle des Genoms integriert wird, die für ein antiapoptotisches Gen kodiert und durch die Integration hochreguliert wird oder an einer Stelle des Genoms integriert, welche für ein proapoptotisches Gen kodiert und durch die Integration runterreguliert wird. Somit könnten diese Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber dem apoptotischen Effekt von NPM-ALK aufweisen. Aufgrund der in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen NPM-ALK gesteuerten Signalkaskade, die zu einem verstärkten Zellzyklus führt, wurden im Verlauf der Kultivierung die nicht transduzierten Zellen von den NPM-ALK transduzierten Zellen überwachsen. Hier bildeten sich teilweise in der FACS Analyse zwei positive Zellpopulationen aus (Abbildung 19). Nachdem in der niedrigen NPM-ALK transduzierten CTLL2 positiven Zellpopulation die FACS Analyse auf NPM-ALK negative ausfiel konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden, dass die NPM-ALK Expression dieser Zellpopulationen unterschiedlich hoch ausfiel (Abbildung 20). Dies deutet daraufhin, dass die FACS Analyse bei einer geringen Expression

des Onkogens nicht sensitive genug ist um es nachzuweisen. Für weiterführende Studien wäre es interessant, die Klonalität dieser Populationen zu untersuchen.

Charakteristisch für das ALCL, hervorgerufen durch das Onkogen NPM-ALK, ist die Expression des Oberflächenmarkers CD30 (84). Ebenso ist häufig ein Verlust der pan T-Zellmarker CD3 und des TCR zu beobachten (89). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. So zeigte sich auch in den NPM-ALK transduzierten CTLL2 die Expression von CD30, wohingegen in den Kontrollzellen keine Expression des Oberflächenmarkers detektiert werden konnte. Spannenderweise zeigten auch die Genexpressionsdaten der bereits 24 Stunden nach NPM-ALK Transduktion analysierten murinen T-Zellen eine Hochregulierung des Gens für den CD30 Rezeptor, *Tnfrsf8* (Tabelle 6). Für den pan T-Zellmarker CD3 und den TCR war nur ein sehr geringer Anteil an Onkogen transduzierten CTLL2 positiv, während der Anteil in den Kontrollzellen deutlich höher lag. Die zytotoxische T-Zelllinie CTLL2 ist eine IL2 abhängige Zelllinie (157). Daher war es nicht verwunderlich, dass sowohl die Kontrollzellen als auch die NPM-ALK transduzierten Zellen positiv ausfielen für die Färbung auf die α -Kette des IL2-Rezeptors CD25 (Abbildung 21).

Aufgrund der kontinuierlichen Aktivität der Tyrosinkinase-Domäne von NPM-ALK werden eine Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden gesteuert und verstärkt, die für die onkogene Wirkung von NPM-ALK verantwortlich sind (2.2.2.1). Im Fall der NPM-ALK transduzierten CTLL2 wiesen die Schlüsselproteine STAT3, ERK1/2 und AKT, welche an diesen intrazellulären Signalkaskaden beteiligt sind, einen erhöhten Phosphorylierungsstatus auf (Abbildung 22). Besonders auffällig war die sehr hohe Expression von pAKT. Die phosphorylierte Form von AKT fördert über den PIK3/AKT Signalweg die Expression des Oberflächenrezeptors CD30, der in den Onkogen transduzierten CTLL2 nachgewiesen werden konnte. Die durch NPM-ALK beschleunigten Signalkaskaden führen unter anderem zu einer verstärkten Zellproliferation. So ist es gut möglich, dass aufgrund einer beschleunigten Zellproliferation die NPM-ALK transduzierten CTLL2 die untransduzierten CTLL2 in den Kulturen überwachsen haben. Dies würde erklären, weshalb gegen Ende der Langzeitkultivierung der CTLL2 die Kulturen fast ausschließlich aus NPM-ALK positiven Zellen bestanden (Abbildung 17).

5.2 TCR-abhängige Verteilungsmuster NPM-ALK transduzierter T-Lymphozyten im Mausmodell

Im nächsten Teil der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob prä-leukämische T-Zellklone im Mausmodell aufgrund ihres TCRs zum Auswachsen auf unterschiedliche lymphatische Regionen angewiesen sind. Für das für diese Studie gewählte Onkogen NPM-ALK sind verschiedene Mausmodelle beschrieben (2.2.3). In den meisten dieser Mausmodelle wurden keine T-Zellen verwendet und die resultierenden Tumore waren meist B-Zelllymphome, Plasmozytome oder lymphoblastische T-Zelllymphome, weshalb sich diese Modelle nicht eigneten, um die TCR-abhängige Verteilung von T-Zellen zu untersuchen. In einem von Newrzela et al beschriebenen Mausmodell wurde gezeigt, dass Onkogen transduzierte TCR monoklonale T-Zellen zu einer Transformation in Rag1-defizienten Empfängertieren führen (1). Hingegen kam es zu keiner Transformation der T-Zellen in einer polyklonalen T-Zellpopulation (2). Um T-Zellen in-vivo detektieren zu können, wurde das beschriebene monoklonale T-Zellmodell bereits in einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe Newrzela modifiziert (nicht veröffentlichte Studie). Hierzu wurde in die für die Transduktion verwendeten Plasmide das Gen der Firefly-Luciferase kloniert, was es ermöglichte die transduzierten T-Zellen in der in-vivo-BLI zu verfolgen.

Dieses Mausmodell wurde in der vorliegenden Dissertation genutzt, um mögliche TCR-abhängige Verteilungsmuster in NPM-ALK transduzierten TCR monoklonalen T-Zellen in-vivo zu analysieren. Die Rag1-defizienten Mäuse wurden mit NPM-ALK transduzierten TCR monoklonalen OT1-Zellen oder TCR monoklonalen P14-Zellen transplantiert (4.2). Im Blut wurde vier Wochen nach Transplantation eine erfolgreiche Repopulation des T-Zelltransplantats nachgewiesen (Abbildung 27). Zusätzlich konnte über das Kontrollgen T-Sapphire für die Kontrolltiere der Anteil an transduzierten T-Zellen im Blut bestimmt werden (Abbildung 28). Die Repopulation und das Engraftment der Onkogen transduzierten T-Zellen konnte nur mittels BLI verfolgt werden, da eine Bestimmung im Blut nicht möglich ist. Interessanterweise zeigte sich, dass die NPM-ALK transduzierten T-Zellen in der BLI erst zu einem späteren Zeitpunkt zu detektieren waren als die T-Zellen in den Kontrolltieren (Abbildung 31). Dieses Ergebnis korreliert mit den Beobachtungen der AG Newrzela aus vorherigen Studien. T-Zell transplantierte Mäuse wurden vier Wochen nach Transplantation euthanasiert und untersucht. Während in den Kontrolltieren die transduzierten T-Zellen in Lymphknoten und Milz ermittelt werden konnten, waren die NPM-ALK transduzierten T-

Zellen weder in Milz noch in Lymphknoten nachweisbar (unveröffentlichte Daten). Die vorliegenden Ergebnisse aus der in-vivo-BLI, als auch die Ergebnisse der unveröffentlichten Daten, könnten ebenfalls auf den paradoxen Effekt einer NPM-ALK vermittelten Apoptose hindeuten, welche in den Experimenten mit den CTLL2 nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 4.1.3). So ist es möglich, dass auch die NPM-ALK transduzierten T-Zellen, welche in die Empfängertiere transplantiert wurden in Apoptose gehen und nur wenige Zellen überleben. Normalerweise führen Onkogene durch ihre Onkogen vermittelten Signalkaskaden zu einer verstärkten Zellproliferation und der Expression von antiapoptotischen Genen (siehe Kapitel 2.2.2.1). Dies führt zur malignen Transformation und zum Auswachsen der Zellen. Unter bestimmten Umständen können Onkogene jedoch auch zur Initiierung von Apoptose und zellulärer Seneszenz führen (169). Allgemein wird diese Initiierung beschrieben als onkogener Stress. Dieser entsteht aufgrund von anhaltender Zellreplikation und DNA Beschädigung induziert durch die gesteigerte Proliferation, welche hervorgerufen wird durch die deregulierte Onkogenaktivität (168).

In der genaueren Auswertung der BLI-Daten zeigte sich, dass sich die transplantierten T-Zellen, sowohl in der OT1-Kontrollgruppe (Abbildung 34A) als auch in der P14-Kontrollgruppe (Abbildung 34C), vor allem in den mesenterialen Lymphknoten ansiedelten. Die Auswertung der BLI Daten der OT1-Onkogengruppe (Abbildung 34B) und der P14-Onkogengruppe (Abbildung 34D) zeigte jedoch keine vermehrte Ansiedlung der NPM-ALK transduzierten T-Zellen in einer bestimmten Region bzw. lymphatischem Organ. Nach dem in Kapitel 2.1.4.1 beschriebenen klonalen Konkurrenz Model, konkurrieren T-Zellen um sp-MHC-Moleküle, sogenannte stimulatorische Nischen. Neueste Studien lassen vermuten, dass sich die verschiedenen sp-MHC-Moleküle auf bestimmte Lokalisationen im Organismus begrenzen lassen (unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung Dr. Kirberg, 2015). Demnach könnten sich T-Zellen aufgrund ihrer TCR-Spezifität insbesondere im Bereich ihres entsprechenden sp-MHC-Moleküls aufhalten, da sie auf die Interaktion mit ihrem sp-MHC-Komplex angewiesen sind, um ein Überlebenssignal zu erhalten. Für die NPM-ALK transduzierten OT1- und P14-Zellen konnte jedoch in der in-vivo-BLI kein einheitliches Verteilungsmuster der T-Zellen erkannt werden. Auch die Beobachtungen der AG Newrzela aus einem früheren Mausmodell mit in-vivo-BLI-Messung, dass es sich bei den poplitealen Lymphknoten um eine mögliche stimulatorische Nische für OT1-Zellen handelt könnte, konnte nicht bestätigt werden (Dissertation Stemann). Bei diesem früheren Mausmodell

wurden lediglich zwei Mäuse untersucht, so dass es durchaus möglich ist dass die Ausbildung der Lymphome im poplitealen Lymphknoten bei beiden Mäusen eine zufällige Beobachtung war. Zusätzlich ist zu beachten, dass monoklonale TCR transgene T-Zellen aufgrund von T-Zell-Promiskuität und Affinität nicht nur mit ihrem spezifischen sp-MHC-Komplexe interagieren können. So konnte in Studien, in welchen das Konkurrenzverhalten verschiedener TCR transgener T-Zellen untersucht wurde, gezeigt werden, dass es für TCR transgene T-Zellen klare Wettbewerbshierarchien gibt. In diesen Wettbewerbshierarchien zeigten sich OT1- und P14-Zellen eher als promiskuitive T-Zellen (72,73). Im für die vorliegende Studie verwendeten Mausmodell wurden die lymphopenischen Empfängertiere mit 5×10^6 TCR monoklonalen T-Zellen transplantiert. Diese TCR monoklonale T-Zellpopulation war somit nur einem intraklonalen Konkurrenzkampf ausgesetzt. Aufgrund von Promiskuität und Affinität des TCRs der OT1- und P14-Zellen siedelten sich die NPM-ALK transduzierten Zellen in den Rag1-defizienten Empfängertieren daher wahrscheinlich nicht nur in ihre hoch-spezifischen stimulatorischen Nischen ein. In weiterführenden Studien sollte daher auf TCR transgene T-Zellen zurückgegriffen werden, die möglichst auf die Nutzung exklusiver stimulatorischer Nischen beschränkt sind (z.B. HA-TCR transgene T-Zellen).

Neben der Interaktion mit sp-MHC Molekülen sind T-Zellen auch auf den Kontakt mit Zytokinen angewiesen (2.1.4) und zeigen je nach T-Zell Art die Expression von verschiedenen Homingmarker-Molekülen (2.1.2). Yang et al zeigten in einer in-vivo-BLI-Studie die zytokinabhängige Ansiedlung von T-Zellen bei der Maus. Während sich $CD4^+$ Gedächtniszellen in mukosaassoziiertem lymphatischen Gewebe ansiedelten (IL7), wurden $CD8^+$ Gedächtniszellen in peripheren Lymphknoten und der Milz (IL15) detektiert (170). Die Ansiedlung von $CD8^+$ Zellen in peripheren Lymphknoten und Milz deckt sich mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten. Jedoch ist zu erwähnen, dass in der Studie von Yang et al mit T-Effektorzellen gearbeitet wurde und diese in Albino Bl6 (Black6) Mäuse transplantiert wurden. Im Gegensatz zu den für diese Arbeit verwendeten Rag1-defizienten Mäusen, besitzen Albino Bl6 Mäuse ein vollständiges T- und B-Zellrepertoire. Während es in den Rag1-defizienten Mäusen somit zu einer lymphopenieinduzierten Proliferation der transplantierten T-Zellen war dies in der Studie von Yang et al nicht der Fall. Somit kann man hier nicht direkte Vergleiche ziehen.

5.3 Das verwendete Mausmodell als Modell für das humane ALK⁺ALCL

Nachdem die Lymphomagenese der NPM-ALK induzierten Lymphome in-vivo verfolgt werden konnte, wurden die entstandenen Tumore hinsichtlich ihrer ALK Expression und der Expression typischer ALK⁺ALCL Marker untersucht (siehe Kapitel 2.2.1). In allen analysierten Tumoren konnte ALK nachgewiesen werden und in nahezu allen Tumoren wurde die Expression von CD30 und ICOS ermittelt (Tabelle 10). In der histologischen Untersuchung der Tumoren (Abbildung 39), zeigte sich nicht der beim Menschen am häufigsten vorkommende großzellige ALK⁺ ALCL Typ (siehe Kapitel 2.2.1). Neben der klassischen großzelligen Variante des ALK⁺ ALCLs, wird ebenfalls eine kleinzellige Variante beim Mensch beschrieben (171). Diese Variante ähnelt morphologisch sehr stark dem Erscheinungsbild der NPM-ALK induzierten Lymphome aus der vorliegenden Studie (Abbildung 39). Die kleinzellige Variante macht etwa 5-10% der ALK⁺ ALCL Fälle aus und zeigt sich als eine monomorphe Zellpopulation aus kleinen Tumorzellen mit klarem Zytoplasma. Häufig zeigen sich Kernkörperchen und die für das ALK⁺ ALCL charakteristischen Hallmarkzellen sind ebenfalls in dieser morphologischen Variante des ALCLs zu finden (171).

Wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, wurden bereits zahlreiche murine Modelle zum ALK⁺ ALCL veröffentlicht, in welchen das onkogene Potential von NPM-ALK nachgewiesen werden konnte. In den transgenen Mausmodellen, in welchen die NPM-ALK Expression durch einen Promotor angetrieben wurde, entstanden zumeist B-Zelllymphome, Plasmazytome oder lymphoblastische T-Zelllymphome (117–119). Auch die Transduktion von HSCs mit NPM-ALK und anschließender Transplantation in bestrahlte Mäuse führte in Abhängigkeit der MOIs in den Empfängertieren in den meisten Fällen zu B-Zelllymphomen, Plasmazytomen oder histiozytenreichen Lymphomen (122,123). Hingegen zeigte das in dieser Studie verwendete modifizierte Mausmodell nach Newrzela et al (2) die Entstehung von T-Zell Lymphomen, welche dem humanen ALK⁺ALCL deutlich ähnelten. Ein entscheidender Nachteil der transgenen Mausmodelle oder auch des HSC-Transplantationsmodells als Modell für das humane ALK⁺ ALCL ist der Zeitpunkt der Onkogenexpression. In den transgenen Tieren beginnt die Onkogenexpression während des DP Stadiums der T-Zellentwicklung im Thymus. Im HSC-Transplantationsmodell wird das Onkogen sogar schon exprimiert bevor eine Differenzierung in die B- oder T-Zelllinie vollzogen wurde. Die Transformation der Zellen im humanen ALK⁺ ALCL findet hingegen in reifen T-Zellen statt. Deshalb wurden im für diese

Studie verwendeten modifizierten Mausmodell nach Newrzela et al (2), reife T-Zellen mit dem Onkogen NPM-ALK transduziert.

Auch wenn das verwendete Mausmodell nicht uneingeschränkt auf den Menschen und Haussäugetiere übertragen werden kann (siehe Kapitel 5.4), zeigte es diverse Vorteile gegenüber den bereits veröffentlichten murinen Modellen zum ALK⁺ ALCL. Neben der Expression von charakteristischen Tumormarkern des ALK⁺ ALCLs in den NPM-ALK induzierten Lymphomen konnten auch morphologische Parallelen zur kleinzelligen Variante des ALK⁺ ALCL aufgezeigt werden. Zusätzlich konnte aufgrund der verwendeten Plasmide, welche das Gen der Firefly-Luciferase enthielten, die Lymphomagenese der NPM-ALK induzierten Lymphome und die Repopulation der transduzierten T-Zellen durch Biolumineszenzmessungen in-vivo verfolgt werden.

5.4 Kritische Betrachtung und Einschränkung des verwendeten Mausmodells

Das für diese Studie genutzte syngene Mausmodell verwendet als Spenderzellen ausschließlich reife T-Zellen, welche ex vivo mittels retroviralem Gentransfer modifiziert wurden. Im Anschluss wurden die genetisch veränderten T-Zellen in Mäuse mit dem gleichen genetischen Hintergrund transplantiert. Da die Transduktion von polyklonalen reifen T-Zellen mit bekannten T-Zellonkogenen eine Transformationsresistenz im Mausmodell zeigte (1), wurden TCR monoklonale transgene T-Zellen verwendet. Als Spendertiere für die TCR transgenen T-Zellen dienten Mäuse vom OT1- und P14-Stamm. In beiden Mausstämmen besteht das TCR transgene T-Zellrepertoire nahezu ausschließlich aus CD8⁺ Zellen (172,173). Die Transplantation einer TCR monoklonalen T-Zellpopulation bringt für diese Arbeit den Vorteil mit sich, dass gezielt untersucht werden kann, ob dieser transgene TCR angewiesen ist auf die Interaktion mit seiner spezifischen stimulatorischen Nische (sp-MHC Komplex), auch wenn dies nicht für OT1- und P14-Zellen nachgewiesen werden konnte. Eine Limitation des Modells besteht jedoch darin, dass der ex vivo durchgeführte retrovirale Gentransfer eine Stimulierung und Expansion der T-Zellen voraussetzt. Durch die Stimulation mit dem jeweiligen spezifischen Peptid für den transgenen TCR der T-Zellen konvertieren die naiven T-Zellen zu T-Gedächtniszellen. Somit ist es in dieser Studie nicht möglich, das Verhalten naiver T-Zellen zu untersuchen. Wie im Kapitel 2.1.4 beschrieben, sind naive T-Zellen in der Peripherie auf Überlebenssignale in Form von sp-MHC-Komplexen und Zytokinen angewiesen, während das Überleben von T-

Gedächtniszellen vor allem von Zytokinen gesteuert wird. Jedoch gibt es auch kontroverse Studien, in welchen gezeigt wurde, dass durch Unterbindung des Kontakts mit sp-MHC Molekülen sowohl naive T-Zellen, als auch T-Gedächtniszellen verschwinden (174,175). Zusätzlich ist zu erwähnen, dass es sich bei den Empfängertieren um Rag1-defiziente Mäuse handelt. Diese bilden aufgrund des Rag1-Gens weder T- noch B-Zellen aus (8). Dadurch kommt es nach Transplantation der T-Zellen in die Rag1-defizienten Empfängertiere zu einer Lymphopenie-induzierten, homöostatischen Proliferation (lymphopenia-induced proliferation - LIP). Die LIP von reifen T-Zellen in Rag1-Mäusen ist bereits gut beschrieben (176) und führt zu einer verstärkten Zellteilung der transplantierten T-Zellen. Die lymphopenischen Rezipienten spielten aber im verwendeten Mausmodell vor allem insofern eine Rolle, weil sich die transplantierten T-Zellen konkurrenzlos ausbreiten konnten (2). Insbesondere vor dem Hintergrund TCR-abhängige stimulatorische Nischen potentieller präleukämischer T-Zellklone zu detektieren, ist ein konkurrenzloses Besetzen von „Nischen“ und ungehindertes Auswachsen der transplantierten T-Zellen vorteilhaft.

Trotz allem sollte erwähnt werden, dass eine TCR monoklonale T-Zellpopulation und lymphopenische Empfängertiere keinesfalls die physiologischen Gegebenheiten eines gesunden Organismus widerspiegeln. In Nachfolgestudien könnte man erwägen Nude-Mäuse einzusetzen. Nude-Mäuse besitzen keinen Thymus, somit besitzen sie keine T-Zellen, jedoch ein vollständiges B-Zellrepertoire (177).

Die hier dargelegten Einschränkungen des verwendeten Mausmodells lassen sich ebenfalls auf die Tiermedizin übertragen. Auch wenn das syngene Mausmodell viele Parallelen zur humanen Variante des ALK⁺ ALCL aufweist und die beim Kleintier beschriebene Variante des ALCLs wiederum aufgrund des Phänotyps, der Morphologie und topographischen Lage viele Gemeinsamkeiten zum humanen ALCL zeigt (siehe Kapitel 2.3) ist es jedoch fraglich, ob das Mausmodell auch als Modell für die Kleintiervariante dienen sollte. Bisher wurden die feline und canine ALCL Fälle nicht weiter untersucht auf die in der humanen Variante charakteristische Expression von CD30 und ALK (149). Somit ist vollkommen unklar, ob diese Tumormarker in der veterinärmedizinischen Varianten des ALCL eine Rolle spielen. Insbesondere die Expression von ALK spielt jedoch in der Humanmedizin eine wichtige Rolle für die Therapie des ALCLs. Da es sich bei ALK um eine Tyrosinkinase handelt, kommen im Zuge der Therapie des ALK⁺ ALCLs häufig Tyrosinkinasehemmer zum Einsatz. Eine weitere diagnostische Charakterisierung der tiermedizinischen ALCL Fälle könnte somit neue

Therapieansätze liefern und von großem Nutzen für die veterinärmedizinischen Patienten sein.

6 Schlussbetrachtung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu eruieren, ob NPM-ALK transduzierte T-Zellen in Abhängigkeit ihres TCRs spezifische Verteilungsmuster in der in-vivo-BLI erkennen lassen. Hierzu wurden die TCR transgenen T-Zellen OT1 oder P14 mit dem Onkogenvektor, NPM-ALK gekoppelt an das Gen der Firefly-Luciferase, transduziert und anschließend in Rag1-defiziente Empfängertiere transplantiert. Sowohl im Blut als auch in den wöchentlichen BLI-Messungen konnte eine Repopulierung des T-Zelltransplantats nachgewiesen werden. Über mehrere Wochen konnten die transduzierten T-Zellen in der BLI detektiert und die Repopulationsdynamiken verfolgt werden. Es zeigte sich, dass sich die biolumineszenten T-Zellen in peripheren Lymphknoten und in der Milz ansiedelten. Ein spezifisches Verteilungsmuster oder, dass sich die prämaligen T-Zellklone vermehrt in einer bestimmten lymphatischen Region ansiedelten, konnte nicht beobachtet werden. Die NPM-ALK induzierten Lymphome waren positiv für die Expression typischer ALK^+ ALCL Marker und zeigten morphologisch starke Parallelen zur kleinzelligen Variante des humanen ALK^+ ALCLs. Ein weiteres Ziel dieser Dissertation war es, den Effekt des Onkogens NPM-ALK auf die zytotoxische T-Zelllinie CTLL2 zu untersuchen. Hierzu wurde das Onkogen mittels retroviraler Transduktion in die Zielzellen eingebracht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Transduktion von NPM-ALK zu einer NPM-ALK induzierten Apoptose und Nekrose führte und nur wenige transduzierte Zellen überlebten. Ebenfalls konnte eine Hochregulierung Apoptose-assoziiierter Gene in Genexpressionsanalysen NPM-ALK transduzierter muriner T-Zellen ermittelt werden. Im erstellten Markerprofil zeigte sich in den NPM-ALK transduzierten CTLL2 im Gegensatz zu den Kontrollzellen eine für das ALK^+ ALCL charakteristische Expression des Oberflächenmarkers CD30 und nur eine geringe Expression des pan T-Zellmarkers CD3 und des TCRs. Eine erhöhte Phosphorylierung der Schlüsselproteine STAT3, ERK1/2 und AKT konnte ebenfalls in den NPM-ALK transduzierten CTLL2 nachgewiesen werden. Diese Schlüsselproteine sind in ihrer phosphorylierten Form aktiv und maßgeblich an intrazellulären Signalkaskaden beteiligt, die nachgewiesenermaßen durch NPM-ALK verstärkt werden.

7 Zusammenfassung

Für die normale T-Zell Homöostase ist beschrieben, dass das Auswachsen von prä-leukämischen T-Zellklonen kontrolliert werden könnte durch den Konkurrenzkampf verschiedener T-Zellklone um stimulatorische Nischen (sp-MHC). So konnte in Studien gezeigt werden, dass TCR monoklonale T-Lymphozyten von TCR transgenen Donortieren, wie OT1 oder P14, nach retroviraler Transduktion mit bekannten T-Zell Onkogenen leicht zu transformieren waren. Hingegen zeigten TCR polyklonale T-Zellpopulationen eine Transformationsresistenz gegenüber diesen Onkogenen. Die experimentellen Daten zeigen deutlich, dass die Entstehung von PTCL durch die TCR Diversität verhindert werden kann. Eine sich aus den vorliegenden Daten ergebende Frage ist, ob die Onkogen transduzierten T-Zellen zum Auswachsen auf die Interaktion mit ihrer exklusiven stimulatorischen Nische angewiesen sind. Hierzu wurde in der vorliegenden Studie das Onkogen NPM-ALK, welches in 80% der humanen ALK⁺ ALCL Fälle nachweisbar ist, gekoppelt an das Gen der Firefly-Luciferase in TCR monoklonale T-Zellpopulationen (OT1, P14) transduziert und anschließend in Rag1-defiziente Empfängertiere transplantiert. Mittels in-vivo-BLI wurde die Lymphomagenese der NPM-ALK induzierten Lymphome verfolgt und auf TCR-abhängige Verteilungsmuster untersucht. Für keine der beiden TCR monoklonalen T-Zellpopulationen konnte im Tier ein gleiches Verteilungsmuster oder eine exklusive stimulatorische Nische ausgemacht werden. Die NPM-ALK induzierten Lymphome waren positiv für die charakteristischen Marker des ALK⁺ ALCLs und zeigten morphologisch starke Parallelen zur kleinzelligen Variante des humanen ALK⁺ ALCL.

Zusätzlich wurde der Effekt von NPM-ALK auf die zytotoxische T-Zelllinie CTLL2 in-vitro untersucht. Die NPM-ALK transduzierten Zellen zeigten kurze Zeit nach Transduktion den paradoxen Effekt einer NPM-ALK induzierten Apoptose. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen konnte in den NPM-ALK transduzierten CTLL2 die Expression des Oberflächenmarkers CD30 nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte eine erhöhte Phosphorylierung der Schlüsselproteine STAT3, AKT und ERK1/2 in den Zellen gezeigt werden. Genexpressionsanalysen von NPM-ALK transduzierten murinen T-Zellen zeigten eine Hochregulierung Apoptose assoziierter Gene.

8 Summary

As it is described for normal T-cell homeostasis, outgrowth of pre-leukemic clones could be controlled by the competition of different T-cell clones for stimulatory niches (sp-MHC). In a previous study, TCR monoclonal T lymphocytes from TCR-transgenic OT1- or P14-donors were readily transformable after retroviral transduction with known T-cell oncogenes. Moreover, TCR polyclonal T-cell populations showed a transformation resistance after transduction with these oncogenes. The experimental data so far clearly demonstrates that outgrowth of peripheral T-cell tumors can be prevented by TCR diversity. Another important question arising from these tantalizing observations is, if the outgrowing T-cell clone is dependent on the interaction with its exclusive niche during malignancy development. Therefore, in this study the oncogene NPM-ALK, which is highly relevant in ALK⁺ ALCL, in combination with the gene of Firefly-Luciferase was transduced in TCR monoclonal T-cell populations (OT1, P14) and transplanted into Rag1-deficient recipients. By using in-vivo-BLI the development of NPM-ALK induced lymphomas were monitored and in-vivo-images were analyzed for possible TCR-dependent pattern. Both TCR monoclonal T-cell populations did not show a TCR-dependent pattern or an exclusive niche in the in-vivo-BLI. NPM-ALK induced lymphomas were positive for characteristic ALK⁺ ALCL markers and showed various morphological similarities according to the small cell variant of the human ALK⁺ ALCL. Additionally, the effect of NPM-ALK was studied in the cytotoxic T-cell line CTLL2 in-vitro. After transduction with the oncogene, CTLL2 showed NPM-ALK induced apoptosis. In contrast to control cells, the expression of CD30 was verified in NPM-ALK transduced CTLL2. Moreover, the phosphorylation status of the key signaling molecules STAT3, AKT and ERK1/2 was increased. Gene expression analyses of NPM-ALK transduced murine T-cells showed an upregulation of apoptosis associated genes.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	T-Zell-Entwicklung im Thymus	6
Abbildung 2	Aufbau des TCRs und des TCR-Komplexes.....	8
Abbildung 3	TCR-Signalwege	11
Abbildung 4	Klonales Konkurrenz-Modell.....	13
Abbildung 5	Histologie des ALK ⁺ ALCLs	16
Abbildung 6	NPM-ALK Signalwege.....	17
Abbildung 7	Schematische Darstellung der Teilschritte bis zur Herstellung von ecotropen Vektorüberständen.....	27
Abbildung 8	Schematische Darstellung des Versuchsaufbau für transduzierte CTLL2- Langzeitkulturen	28
Abbildung 9	Schematische Darstellung der weiterführenden Untersuchungen der transduzierten CTLL2-Langzeitkulturen	28
Abbildung 10	Schematische Darstellung der Versuchsplanung des Apoptose Assay von transduzierten CTLL2	29
Abbildung 11	Schematische Darstellung der erstellten Genexpressionsprofile	29
Abbildung 12	Schematische Darstellung des Mausmodells und zeitlicher Ablauf.....	30
Abbildung 13	Zeitlicher Ablauf der BLI Messung.....	31
Abbildung 14	Schematische Darstellung der Folgeuntersuchung nach Auftreten eines klinisch manifesten Tumors	31
Abbildung 15	Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren	32
Abbildung 16	Transduktionseffizienzen der CTLL2 Kulturen im FACS-Blot.....	47
Abbildung 17	GFP Expression der transduzierten CTLL2-Langzeitkulturen	48
Abbildung 18	Apoptose Assay von NPM-ALK transduzierten CTLL2	49
Abbildung 19	FACS Blots der CTLL2-Langzeitkulturen nach Anstieg der GFP Expression	50
Abbildung 20	Onkogen Expression in transduzierten CTLL2 Populationen	51
Abbildung 21	Mittelwerte der Markerprofile von CTLL2 Kontrollzellen und NPM-ALK transduzierter CTLL2.....	53
Abbildung 22	Protein Phosphorylierung in NPM-ALK transduzierten CTLL2	54
Abbildung 23	Gruppierte Hitzekarte (Heatmap) der Genexpression	55
		87

Abbildung 24	Vereinfachte Darstellung des verwendeten Mausmodells	57
Abbildung 25	Transduktionseffizienzen transduzierter OT1 Zellen	58
Abbildung 26	Transduktionseffizienzen transduzierter P14- Zellen.....	59
Abbildung 27	Blutanalyse T-Zell transplanterter Rag1-Rezipienten.....	60
Abbildung 28	T-Sapphire Expression der peripheren T-Zellen in der OT1- und P14- Kontrollgruppe	61
Abbildung 29	Zeitlicher Verlauf der BLI Messung.....	62
Abbildung 30	Ganzkörper-ROI in der ventrodorsalen BLI-Aufnahme	63
Abbildung 31	Mittelwerte der biolumineszenten Strahlung gegenüber der Nullmessung	63
Abbildung 32	BLI Ganzkörpermessungen der OT1- und P14-Kontrollgruppe und der Einzeltiere der OT1- und P14-Onkogengruppe	65
Abbildung 33	Einteilung der ROIs	66
Abbildung 34	Einzel-ROI Auswertung im Netzdiagramm.....	67
Abbildung 35	BLI Aufnahmen einer Kontrollmaus aus der OT1- und der P14- Kontrollgruppe	68
Abbildung 36	BLI-Aufnahmen von Onkogenmäusen aus der OT1- und der P14- Onkogengruppe.....	69
Abbildung 37	Kumulatives Überleben der Versuchstiergruppen.....	70
Abbildung 38	Einzel-ROI Auswertung und entnommene veränderte Organe.....	70
Abbildung 39	Histologie eines NPM-ALK induzierten Lymphoms in der Maus.....	73

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Antikörper	23
Tabelle 2	Zelllinien und primäre Zellen.....	25
Tabelle 3	Plasmide und Vektoren.....	26
Tabelle 4	Mausstämme.....	26
Tabelle 5	Herstellung DNA/CaCl ₂ Mix.....	38
Tabelle 6	Liste hochregulierter Apoptose assoziierter Gene	56
Tabelle 7	Übersicht Versuchstiergruppen	59
Tabelle 8	Legende ROI Regionen	67
Tabelle 9	Tumorlokalisierung und höchstes BLI Signal.....	71
Tabelle 10	Expression von NPM-ALK und Tumormarkern (CD30 und ICOS) in entfernten Lymphomen	72
Tabelle 11	Chemikalien und Lösungen	108
Tabelle 12	Puffer und zusammengesetzte Lösungen.....	110
Tabelle 13	Geräte	111
Tabelle 14	Verbrauchsmaterial	113
Tabelle 15	Kommerzielle Kits	114
Tabelle 16	Medien	115
Tabelle 17	Genotyp-Schlüssel E.coli	115
Tabelle 18	Legende Genexpressionsdaten	118

11 Abkürzungsverzeichnis

AICD	Activation-induced cell death (deutsch: aktivierungsinduzierter T-Zelltod)
AKT	Proteinkinase B
ALCL	Anaplastic Large Cell Lymphoma (deutsch: Anaplastisches großzelliges Lymphom)
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
APC	Antigen presenting cell (deutsch: Antigenpräsentierende Zelle)
B-LCL	Large B-Cell Lymphoma (deutsch: großzelliges B-Zell Lymphom)
BLI	Bioluminescence Imaging (deutsch: biolumineszente Bildgebung)
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation (deutsch: Unterscheidungsgruppen)
CDR	Complementarity determining region (deutsch: Antigenbindestelle)
CTL	Zytotoxische T-Zellen
CTLA4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppelt negativ
DNA	Deoxyribonucleic acid (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
DP	Doppelt positiv
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (deutsch: Ethylendiamintetraessigsäure)
Env	Envelope (deutsch: Hüllprotein)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazelluläre signalregulierende Kinase
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting (deutsch: Durchflusszytometrie)
FBS	Fötales bovines Serum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
Gag	Gruppenspezifische Antigene
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	Hydroxyethylpiperazineethanesulfonic acid (deutsch: Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure)

HSC	Hematopoietic stem cell (deutsch: Hämatopoetische Stammzelle)
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
IP ₃	Inositol-triphosphat
IRES	internal ribosome entry site
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
i.v.	Intravenös
IVC	Individually ventilated cages (deutsch: individuell ventilierte Käfige)
JAK	Januskinase
KM	Knochenmark
LAT	Linker for activation of T cells
LB	Lysogeny broth (Nährmedium)
LIP	Lymphopenie-induzierte Proliferation
Ln	Lymphknoten
Lnn	Lymphknoten (Plural)
LTR	Long Terminal Repeat
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex (deutsch: Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOI	Multiplicity of infection (deutsch: Multiplizität der Infektion)
MTCL	Mature T-cell lymphoma (deutsch: Reife T-Zell Lymphome)
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NHL	Non-Hodgkin Lymphome
NK	Natürliche Killerzellen
NPM	Nucleophosmin
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate buffered saline (deutsch: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PIK3	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Protein-Kinase C
PLC γ	Phospholipase- γ
Pol	Polymerase
PTCL	Peripheral T-cell leukemias/lymphomas (deutsch: Periphere T-Zell Leukämie/Lymphome)
RAG	Recombination activating gene
ROI	Region of Interest (deutsch: Bereich von Interesse)

Rpm	Rounds per minute (deutsch: Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SLP-76	Leukocyte protein of 76 kDa
SP	Single positive (einfach positiv)
sp-MHCs	Selbst Peptid-Hauphistokompatibilitätskomplex
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T _{CM}	Zentrale T-Gedächtniszellen
T _{EM}	Effektor-T-Gedächtniszellen
TCR	T cell receptor (deutsch: T-Zell-Rezeptor)
Tfh	Follikuläre T-Helferzelle
Th	T-Helferzelle
TK	Tyrosinkinase
T-LBL	T-lymphoblastic lymphoma (deutsch: lymphoblastisches T-Zell Lymphom)
Treg	Regulatorische T-Helferzelle
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wPRE	Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element

12 Literaturverzeichnis

1. Newrzela S, Cornils K, Li Z, Baum C, Brugman MH, Hartmann M, et al. Resistance of mature T cells to oncogene transformation. *Blood*. 2008;112(6):2278–86.
2. Newrzela S, Al-Ghaili N, Heinrich T, Petkova M, Hartmann S, Rengstl B, et al. T-cell receptor diversity prevents T-cell lymphoma development. *Leukemia*. 2012.
3. Kaufmann SH. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci* . 1996;93(6):2272–9.
4. Matzinger P, Guerder S. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature*. 1989;338(6210):74–6.
5. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. 2002 (5):309–22.
6. Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* . 1993 15;150(10):4244–52.
7. Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*. 1989 22;59(6):1035–48.
8. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. 1992 r 6;68(5):869–77.
9. Shinkai Y, Koyasu S, Nakayama K, Murphy KM, Loh DY, Reinherz EL, et al. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science*. 1993 5;259(5096):822–5.
10. Groettrup M, Ungewiss K, Azogui O, Palacios R, Owen MJ, Hayday AC, et al. A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor beta chain and a 33 kd glycoprotein. *Cell*. 1993 22;75(2):283–94.
11. von Boehmer H, Fehling HJ. Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:433–52.
12. Falk I, Nerz G, Haidl I, Krotkova A, Eichmann K. Immature thymocytes that fail to express TCRbeta and/or TCRgamma delta proteins die by apoptotic cell death in the CD44(-)CD25(-) (DN4) subset. *Eur J Immunol*. 2001;31(11):3308–17.
13. Robey E, Fowlkes BJ. Selective Events in T Cell Development. *Annu Rev Immunol*.

1994;12(1):675–705.

14. Scott B, Blüthmann H, Teh HS, von Boehmer H. The generation of mature T cells requires interaction of the alpha beta T-cell receptor with major histocompatibility antigens. *Nature*. 1989 13;338(6216):591–3.
15. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*. 1987 24;49(2):273–80.
16. Kisielow P, Blüthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature*. 1988 23;333(6175):742–6.
17. Kreslavsky T, Kim H-J, Koralov SB, Ghitza D, Buch T, Cantor H, et al. Negative selection, not receptor editing, is a physiological response of autoreactive thymocytes. *J Exp Med*. 2013 23;210(10):1911–8.
18. Xing Y, Hogquist KA. T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 1;4(6):a006957–a006957.
19. Kawabe Y, Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature*. 1991 17;349(6306):245–8.
20. Strasser A, Pellegrini M. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol*. 2004;25(11):610–5.
21. Kruse A. Die lymphatischen Organe: Blutbildung und Konferenzzentren. *Immunologie für Einsteiger*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 15–31.
22. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996 5;272(5258):60–6.
23. Meuer SC, Schlossman SF, Reinherz EL. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions. *Proc Natl Acad Sci*. 1982 1;79(14):4395–9.
24. Reinherz EL, Meuer SC, Schlossman SF. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. *Immunol Today*. 1983;4(1):5–8.
25. Weenink SM, Gautam AM. Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Cell Biol*. 1997;75(1):69–81.
26. Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*. 2001 1;410(6824):101–5.

27. Masopust D. Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. *Science* (80-). 2001 23;291(5512):2413–7.
28. Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: Two pathways and multiple effector molecules. *Immunity*. 1994;1(5):343–6.
29. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations *. *Annu Rev Immunol*. 2010;28(1):445–89.
30. Wambre E, James EA, Kwok WW. Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(6):700–6.
31. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015 ;74(1):5–17.
32. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*. 2000 12;321(7258):424.
33. Vahedi G, C Poholek A, Hand TW, Laurence A, Kanno Y, O’Shea JJ, et al. Helper T-cell identity and evolution of differential transcriptomes and epigenomes. *Immunol Rev*. 2013;252(1):24–40.
34. Schmitt N, Ueno H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Curr Opin Immunol*. 2015;34:130–6.
35. Schmitt E, Klein M, Bopp T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2014;35(2):61–8.
36. Wojciechowski S, Jordan MB, Zhu Y, White J, Zajac AJ, Hildeman DA. Bim mediates apoptosis of CD127lo effector T cells and limits T cell memory. *Eur J Immunol*. 2006;36(7):1694–706.
37. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. Macmillian Magazines Ltd.; 1999 14;401(6754):708–12.
38. Kappler J, Kubo R, Haskins K, Hannum C, Marrack P, Pigeon M, et al. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells in mouse and man: identification of constant and variable peptides. *Cell*. 1983;35(1):295–302.
39. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988 4;334(6181):395–402.
40. Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. 2009. 1119 p.
41. Venturi V, Price DA, Douek DC, Davenport MP. The molecular basis for public T-cell

- responses? *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):231–8.
42. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:419–66.
 43. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591–619.
 44. Guy CS, Vignali KM, Temirov J, Bettini ML, Overacre AE, Smeltzer M, et al. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(3):262–70.
 45. Gross JA, Callas E, Allison JP. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J Immunol*. 1992 15;149(2):380–8.
 46. Freedman AS, Freeman GJ, Rhyndhart K, Nadler LM. Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell Immunol*. 1991 15;137(2):429–37.
 47. Iwashima M, Irving BA, van Oers NS, Chan AC, Weiss A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*. 1994 25;263(5150):1136–9.
 48. Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP, Samelson LE. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*. 1998 9;92(1):83–92.
 49. Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(1):67–78.
 50. Lin J, Weiss A. T cell receptor signalling. *J Cell Sci*. 2001 15;114(2):243–4.
 51. Ebinu JO, Stang SL, Teixeira C, Bottorff DA, Hooton J, Blumberg PM, et al. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood*. 2000 15;95(10):3199–203.
 52. Su B, Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol*. 1996 Jun;8(3):402–11.
 53. Che T, You Y, Wang D, Tanner MJ, Dixit VM, Lin X. MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem*. 2004 16;279(16):15870–6.
 54. Hayashi K, Altman A. Protein kinase C theta (PKCtheta): a key player in T cell life and death. *Pharmacol Res*. 2007;55(6):537–44.
 55. Schulze-Luehrmann J, Ghosh S. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B.

- Immunity. 2006;25(5):701–15.
56. Kane LP, Lin J, Weiss A. It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends Immunol.* 2002;23(8):413–20.
 57. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007 29;129(7):1261–74.
 58. Bai D, Ueno L, Vogt PK. Akt-mediated regulation of NFkB and the essentialness of NFkB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer.* 2009 15;125(12):2863–70.
 59. Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. The many forks in FOXO's road. *Sci STKE.* 2003 4;2003(172):RE5.
 60. Hay N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004 15;18(16):1926–45.
 61. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature.* 1998 Oct 15;395(6703):645–8.
 62. Hayashi T, Mo J-H, Gong X, Rossetto C, Jang A, Beck L, et al. 3-Hydroxyanthranilic acid inhibits PDK1 activation and suppresses experimental asthma by inducing T cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 20;104(47):18619–24.
 63. Tanchot C, Rosado MM, Agenes F, Freitas AA, Rocha B. Lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol.* 1997;9(6):331–7.
 64. Freitas A, Chen J. Introduction: regulation of lymphocyte homeostasis. *Microbes Infect.* 2002;4(5):529–30.
 65. Ge Q, Hu H, Eisen HN, Chen J. Naïve to memory T-cell differentiation during homeostasis-driven proliferation. *Microbes Infect.* 2002;4(5):555–8.
 66. Mahajan VS, Leskov IB, Chen JZ. Homeostasis of T cell diversity. *Cell Mol Immunol.* 2005;2(1):1–10.
 67. Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med.* 1996 1;183(6):2533–40.
 68. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev.* 2003;193:70–81.
 69. Broome HE, Dargan CM, Krajewski S, Reed JC. Expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal. *J Immunol.* 1995 1;155(5):2311–7.
 70. Takada K, Jameson SC. Naïve T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(12):823–32.
 71. Troy AE, Shen H. Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes

- is regulated by clonal competition. *J Immunol*. 2003 15;170(2):672–6.
72. Kieper WC, Burghardt JT, Surh CD. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J Immunol*. 2004 1;172(1):40–4.
 73. Agenes F, Dangy J-P, Kirberg J. T cell receptor contact to restricting MHC molecules is a prerequisite for peripheral interclonal T cell competition. *J Exp Med*. 2008 3;205(12):2735–43.
 74. Hao Y. The clone size of peripheral CD8 T cells is regulated by TCR promiscuity. *J Exp Med*. 2006 3;203(7):1643–9.
 75. Vose J, Armitage J, Weisenburger D, International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol*. 2008 1;26(25):4124–30.
 76. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 12;117(19):5019–32.
 77. Foss FM, Zinzani PL, Vose JM, Gascoyne RD, Rosen ST, Tobinai K. Peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2011 14;117(25):6756–67.
 78. Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*. 1985;66(4):848–58.
 79. Kinney MC, Higgins RA, Medina EA. Anaplastic large cell lymphoma: twenty-five years of discovery. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(1):19–43.
 80. Boi M, Zucca E, Inghirami G, Bertoni F. Advances in understanding the pathogenesis of systemic anaplastic large cell lymphomas. *Br J Haematol*. 2015;168(6):771–83.
 81. Lage LA de PC, Cabral TC dos S, Costa R de O, Gonçalves M de C, Levy D, Zerbini MCN, et al. Primary nodal peripheral T-cell lymphomas: diagnosis and therapeutic considerations. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(4):277–84.
 82. Fornari A, Piva R, Chiarle R, Novero D, Inghirami G. Anaplastic large cell lymphoma: one or more entities among T-cell lymphoma? *Hematol Oncol*. 2009;27(4):161–70.
 83. Amin HM, Lai R. Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 2007. p. 2259–67.
 84. Falini B, Pileri S, Pizzolo G, Dürkop H, Flenghi L, Stirpe F, et al. CD30 (Ki-1) molecule: a

- new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood*. 1995 1;85(1):1–14.
85. Morris SW, Naeve C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, Cui X, et al. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene*. 1997;14(18):2175–88.
 86. Li R, Morris SW. Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) small-molecule inhibitors for cancer therapy. *Med Res Rev*. 2008;28(3):372–412.
 87. Zhang Q, Wang H, Kantekure K, Paterson JC, Liu X, Schaffer A, et al. Oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK induces expression of the growth-promoting receptor ICOS. *Blood*. 2011 15;118(11):3062–71.
 88. Wellmann A, Otsuki T, Vogelbruch M, Clark HM, Jaffe ES, Raffeld M. Analysis of the t(2;5)(p23;q35) translocation by reverse transcription- polymerase chain reaction in CD30+ anaplastic large-cell lymphomas, in other non-Hodgkin's lymphomas of T-cell phenotype, and in Hodgkin's disease. *Blood*. 1995 15;86(6):2321–8.
 89. Bonzheim I, Geissinger E, Roth S, Zettl A, Marx A, Rosenwald A, et al. Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood*. 2004 5;104(10):3358–60.
 90. Foss HD, Anagnostopoulos I, Araujo I, Assaf C, Demel G, Kummer JA, et al. Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood*. 1996 15;88(10):4005–11.
 91. Krenacs L, Wellmann A, Sorbara L, Himmelmann AW, Bagdi E, Jaffe ES, et al. Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphomas of T- and null-cell type and Hodgkin's disease: evidence for distinct cellular origin. *Blood*. 1997 1;89(3):980–9.
 92. Jaffe ES. Anaplastic large cell lymphoma: the shifting sands of diagnostic hematopathology. *Mod Pathol*. 2001;14(3):219–28.
 93. de Leval L, Gaulard P. Tricky and Terrible T-Cell Tumors: These are Thrilling Times for Testing: Molecular Pathology of Peripheral T-Cell Lymphomas. *Hematology*. 2011. p. 336–43.
 94. Stein H, Foss HD, Dürkop H, Marafioti T, Delsol G, Pulford K, et al. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*. 2000 1;96(12):3681–95.

95. Falini B, Martelli MP. Anaplastic large cell lymphoma: changes in the World Health Organization classification and perspectives for targeted therapy. *Haematologica*. 2009 1;94(7):897–900.
96. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994 4;263(5151):1281–4.
97. Kaneko Y, Frizzera G, Edamura S, Maseki N, Sakurai M, Komada Y, et al. A novel translocation, t(2;5)(p23;q35), in childhood phagocytic large T-cell lymphoma mimicking malignant histiocytosis. *Blood*. 1989 15;73(3):806–13.
98. Bitter MA, Franklin WA, Larson RA, McKeithan TW, Rubin CM, Le Beau MM, et al. Morphology in Ki-1(CD30)-positive non-Hodgkin's lymphoma is correlated with clinical features and the presence of a unique chromosomal abnormality, t(2;5)(p23;q35). *Am J Surg Pathol*. 1990;14(4):305–16.
99. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 1997;14(4):439–49.
100. Lin E, Li L, Guan Y, Soriano R, Rivers CS, Mohan S, et al. Exon Array Profiling Detects EML4-ALK Fusion in Breast, Colorectal, and Non-Small Cell Lung Cancers. *Mol Cancer Res*. 2009 1;7(9):1466–76.
101. Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. Multiplex Reverse Transcription-PCR Screening for EML4-ALK Fusion Transcripts. *Clin Cancer Res*. 2008 15;14(20):6618–24.
102. Griffin CA, Hawkins AL, Dvorak C, Henkle C, Ellingham T, Perlman EJ. Recurrent Involvement of 2p23 in Inflammatory Myofibroblastic Tumors. *Cancer Res*. 1999 15;59(12):2776–80.
103. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. Macmillan Publishers Limited. All rights reserved; 2008 16;455(7215):971–4.
104. Gascoyne RD, Lamant L, Martin-Subero JI, Lestou VS, Harris NL, Müller-Hermelink H-K, et al. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases. *Blood*. 2003 22;102(7):2568–73.
105. Jazii F-R, Najafi Z, Malekzadeh R, Conrads T-P, Ziaee A-A, Abnet C, et al. Identification

- of squamous cell carcinoma associated proteins by proteomics and loss of beta tropomyosin expression in esophageal cancer. *World J Gastroenterol*. 2006 28;12(44):7104–12.
106. Zamo A, Chiarle R, Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosi M, et al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene*. 2002;21(7):1038–47.
 107. Khoury JD, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, Yared MA, Tsioli P, Leventaki V, et al. Differential expression and clinical significance of tyrosine-phosphorylated STAT3 in ALK+ and ALK- anaplastic large cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2003 1;9(10 Pt 1):3692–9.
 108. Piva R, Agnelli L, Pellegrino E, Todoerti K, Grosso V, Tamagno I, et al. Gene Expression Profiling Uncovers Molecular Classifiers for the Recognition of Anaplastic Large-Cell Lymphoma Within Peripheral T-Cell Neoplasms. *J Clin Oncol*. 2010 20;28(9):1583–90.
 109. Chiarle R, Simmons WJ, Cai H, Dhall G, Zamo A, Raz R, et al. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med*. 2005 ;11(6):623–9.
 110. Kasprzycka M, Marzec M, Liu X, Zhang Q, Wasik MA. Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 27;103(26):9964–9.
 111. Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, Lin Q, Fujio Y, Kunisada K, et al. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene*. 2004 15;23(32):5426–34.
 112. Bai R-Y, Ouyang T, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J. Nucleophosmin–anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood*. 2000 15;96(13):4319–27.
 113. Gu T-L, Tothova Z, Scheijen B, Griffin JD, Gilliland DG, Sternberg DW. NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood*. 2004 15;103(12):4622–9.
 114. Watanabe M, Sasaki M, Itoh K, Higashihara M, Umezawa K, Kadin ME, et al. JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell

- lymphoma and reed-sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 2005 1;65(17):7628–34.
115. Staber PB, Vesely P, Haq N, Ott RG, Funato K, Bambach I, et al. The oncoprotein NPM-ALK of anaplastic large-cell lymphoma induces JUNB transcription via ERK1/2 and JunB translation via mTOR signaling. *Blood.* 2007 1;110(9):3374–83.
 116. Merkel O, Hamacher F, Laimer D, Sifft E, Trajanoski Z, Scheideler M, et al. Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)+ and ALK- anaplastic large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci.* 2010 14;107(37):16228–33.
 117. Chiarle R, Gong JZ, Guasparri I, Pesci A, Cai J, Liu J, et al. NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumors. *Blood.* 2003;101(5):1919–27.
 118. Turner SD, Tooze R, MacLennan K, Alexander DR. Vav-promoter regulated oncogenic fusion protein NPM-ALK in transgenic mice causes B-cell lymphomas with hyperactive Jun kinase. *Oncogene.* 2003 30;22(49):7750–61.
 119. Jäger R, Hahne J, Jacob A, Egert A, Schenkel J, Wernert N, et al. Mice transgenic for NPM-ALK develop non-Hodgkin lymphomas. *Anticancer Res.* 2005;25(5):3191–6.
 120. Uyttenhove, C Druez, J C Renauld, M Hérin, H Noël JVS. Autonomous growth and tumorigenicity induced by P40/interleukin 9 cDNA transfection of a mouse P40-dependent T cell line. *J Exp Med. The Rockefeller University Press;* 1991 1;173(2):519–22.
 121. Bittner C, Feller AC, Renauld JC, Lange K, Pietrzik R, Jenetzky C, et al. An Animal Model for Anaplastic Large Cell Lymphoma in the Immunocompetent Syngeneic C57Bl/6 Mouse. *Lab Invest.* 80(10):1523–31.
 122. Kuefer MU, Look AT, Pulford K, Behm FG, Pattengale PK, Mason DY, et al. Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice. *Blood.* 1997 15;90(8):2901–10.
 123. Miething C, Grudler R, Fend F, Hoepfl J, Mugler C, von Schilling C, et al. The oncogenic fusion protein nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) induces two distinct malignant phenotypes in a murine retroviral transplantation model. *Oncogene.* 2003 24;22(30):4642–7.
 124. Renauld JC, van der Lugt N, Vink A, van Roon M, Godfraind C, Warnier G, et al. Thymic

- lymphomas in interleukin 9 transgenic mice. *Oncogene*. 1994;9(5):1327–32.
125. Lange K, Uckert W, Blankenstein T, Nadrowitz R, Bittner C, Renauld J-C, et al. Overexpression of NPM-ALK induces different types of malignant lymphomas in IL-9 transgenic mice. *Oncogene*. 2003 30;22(4):517–27.
 126. Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, et al. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Cancer Surv*. 1987;6(1):139–59.
 127. Djilali S, Parodi AL. The BLV-induced leukemia--lymphosarcoma complex in sheep. *Vet Immunol Immunopathol*. 1989 ;22(3):233–44.
 128. JARRETT WF, MARTIN WB, CRIGHTON GW, DALTON RG, STEWART MF. TRANSMISSION EXPERIMENTS WITH LEUKEMIA (LYMPHOSARCOMA). *Nature*. 1964 9;202:566–7.
 129. JARRETT WF, CRAWFORD EM, MARTIN WB, DAVIE F. A VIRUS-LIKE PARTICLE ASSOCIATED WITH LEUKEMIA (LYMPHOSARCOMA). *Nature*. 1964 9;202:567–9.
 130. Weiss RA, Vogt PK. 100 years of Rous sarcoma virus. *J Exp Med*. 2011 21;208(12):2351–5.
 131. GROSS L. “Spontaneous” leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1951;76(1):27–32.
 132. Fournel-Fleury C, Ponce F, Felman P, Blavier A, Bonnefont C, Chabanne L, et al. Canine T-cell Lymphomas: A Morphological, Immunological, and Clinical Study of 46 New Cases. *Vet Pathol*. 2002 1;39(1):92–109.
 133. Hayes HM, Tarone RE, Cantor KP, Jessen CR, McCurnin DM, Richardson RC. Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog owner’s use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. *J Natl Cancer Inst*. 1991 4;83(17):1226–31.
 134. Hayes HM, Tarone RE, Cantor KP. On the association between canine malignant lymphoma and opportunity for exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environ Res*. 1995;70(2):119–25.
 135. Garabrant DH, Philbert MA. Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Epidemiology and Toxicology. *Crit Rev Toxicol*. 2002 29;32(4):233–57.
 136. Hahn KA, Richardson RC, Hahn EA, Chrisman CL. Diagnostic and Prognostic Importance

- of Chromosomal Aberrations Identified in 61 Dogs with Lymphosarcoma. *Vet Pathol.* 1994 1;31(5):528–40.
137. Thomas R, Smith KC, Ostrander EA, Galibert F, Breen M. Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. *Br J Cancer.* 2003 20;89(8):1530–7.
 138. BAECKGREN AW. LYMPHATIC LEUKOSIS IN DOGS. AN EPIZOOTOLOGICAL, CLINICAL AND HAEMATOLOGICAL STUDY. *Acta Vet Scand.* 1965;6 Suppl 1:1–80.
 139. Priester WA. Canine lymphoma: relative risk in the boxer breed. *J Natl Cancer Inst.* 1967;39(5):833–45.
 140. Dorn CR, Taylor DO, Hibbard HH. Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *Am J Vet Res.* 1967;28(125):993–1001.
 141. Teske E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Q.* 1994;16(4):209–19.
 142. Marconato L, Leo C, Girelli R, Salvi S, Abramo F, Bettini G, et al. Association between waste management and cancer in companion animals. *J Vet Intern Med.* 23(3):564–9.
 143. Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF, Bostock DE, Nicholls P, Hoather TM, et al. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J Small Anim Pract.* 2001;42(8):377–84.
 144. Ernst T, Kessler M, Lautscham E, Willimzig L, Neiger R. Multicentric lymphoma in 411 dogs – an epidemiological study. *Tierärztliche Prax Ausgabe K Kleintiere / Heimtiere.* 2016 25;44(4):245–51.
 145. Marconato L, Gelain ME, Comazzi S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol.* 2013 ;31(1):1–9.
 146. Schneider R. Comparison of age- and sex-specific incidence rate patterns of the leukemia complex in the cat and the dog. *J Natl Cancer Inst.* 1983;70(5):971–7.
 147. Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W, Moore PF. World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals: Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals. *Armed Force Inst Pathol Am Regist Pathol.* 2002;
 148. Vezzali E, Parodi AL, Marcato PS, Bettini G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol.* 2010;8(1):38–49.

149. Valli VE, Myint MS, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, et al. Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. *Vet Pathol.* 2011 1;48(1):198–211.
150. Valli VE, Kass PH, Myint MS, Scott F. Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. *Vet Pathol.* 2013 1;50(5):738–48.
151. Ponce F, Marchal T, Magnol JP, Turinelli V, Ledieu D, Bonnefont C, et al. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol.* 2010 ;47(3):414–33.
152. Lurie DM, Lucroy MD, Griffey SM, Simonson E, Madewell BR. T-cell-derived malignant lymphoma in the boxer breed. *Vet Comp Oncol.* 2004 ;2(3):171–5.
153. Lurie DM, Milner RJ, Suter SE, Vernau W. Immunophenotypic and cytomorphologic subclassification of T-cell lymphoma in the boxer breed. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008 15;125(1–2):102–10.
154. Wolfesberger B, Skor O, Hammer SE, Flickinger I, Kleiter M, Rütgen BC, et al. Does categorisation of lymphoma subtypes according to the World Health Organization classification predict clinical outcome in cats? *J Feline Med Surg.* 2016 30;
155. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol.* 1987 ;7(1):379–87.
156. Hartley JW, Rowe WP. Clonal cells lines from a feral mouse embryo which lack host-range restrictions for murine leukemia viruses. *Virology.* 1975 ;65(1):128–34.
157. Gillis S, Smith KA. Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature.* 1977 14;268(5616):154–6.
158. Stitz J, Buchholz CJ, Engelstädter M, Uckert W, Bloemer U, Schmitt I, et al. Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology.* 2000 20;273(1):16–20.
159. Schambach A, Wodrich H, Hildinger M, Böhne J, Kräusslich HG, Baum C. Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther.* 2000 ;2(5):435–45.
160. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al.

- Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10):R80.
161. Huber W, von Heydebreck A, Sültmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics.* 2002;18 Suppl 1:S96-104.
 162. Tukey JW. *Exploratory Data Analysis.* Addison-Wesley Addison-Wesley, Reading Massachusetts, USA, 1977;
 163. Fischer P, Nacheva E, Mason DY, Sherrington PD, Hoyle C, Hayhoe FG, et al. A Ki-1 (CD30)-positive human cell line (Karpas 299) established from a high-grade non-Hodgkin's lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor beta-chain gene. *Blood.* 1988;72(1):234–40.
 164. Epstein AL, Levy R, Kim H, Henle W, Henle G, Kaplan HS. Biology of the human malignant lymphomas. IV. Functional characterization of ten diffuse histiocytic lymphoma cell lines. *Cancer.* 1978;42(5):2379–91.
 165. Siminovitch KA, Jensen JP, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Immunoglobulin gene rearrangements and expression in diffuse histiocytic lymphomas reveal cellular lineage, molecular defects, and sites of chromosomal translocation. *Blood.* 1986;67(2):391–7.
 166. Morgan R, Smith SD, Hecht BK, Christy V, Mellentin JD, Warnke R, et al. Lack of involvement of the c-fms and N-myc genes by chromosomal translocation t(2;5)(p23;q35) common to malignancies with features of so-called malignant histiocytosis. *Blood.* 1989;73(8):2155–64.
 167. Amin AD, Rajan SS, Liang WS, Pongtorpipat P, Groysman MJ, Tapia EO, et al. Evidence Suggesting That Discontinuous Dosing of ALK Kinase Inhibitors May Prolong Control of ALK+ Tumors. *Cancer Res.* 2015 15;75(14):2916–27.
 168. Ceccon M, Merlo MEB, Mologni L, Poggio T, Varesio LM, Menotti M, et al. Excess of NPM-ALK oncogenic signaling promotes cellular apoptosis and drug dependency. *Oncogene.* 2015 14;
 169. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 2008 7;319(5868):1352–5.
 170. Yang L, Yu Y, Kalwani M, Tseng TWJ, Baltimore D. Homeostatic cytokines orchestrate the segregation of CD4 and CD8 memory T-cell reservoirs in mice. *Blood.*

2011;118(11):3039–50.

171. Kinney MC, Collins RD, Greer JP, Whitlock JA, Sioutos N, Kadin ME. A small-cell-predominant variant of primary Ki-1 (CD30)+ T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 1993;17(9):859–68.
172. Clarke SR, Barnden M, Kurts C, Carbone FR, Miller JF, Heath WR. Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol Cell Biol*. 2000;78(2):110–7.
173. Pircher H, Bürki K, Lang R, Hengartner H, Zinkernagel RM. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature*. 1989 30;342(6249):559–61.
174. Polic B, Kunkel D, Scheffold A, Rajewsky K. How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 17;98(15):8744–9.
175. Labrecque N, Whitfield LS, Obst R, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. How much TCR does a T cell need? *Immunity*. 2001;15(1):71–82.
176. Min B, Paul WE. Endogenous proliferation: burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings. *Semin Immunol*. 2005;17(3):201–7.
177. Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*. 1968 27;217(5126):370–1.

13 Anhang

13.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen

Tabelle 11 Chemikalien und Lösungen

Substanz	Hersteller
4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma, St.Louis, Missouri, USA
Ampicillin (sodium salt)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-mercaptoethanol	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, St.Louis, Missouri, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
CellTrace Violet Cell Proliferation Kit	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Chloroquine	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Destilliertes Wasser	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
D-Luciferin	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	BioRad, Hercules, California, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
FcR Blocking Reagenz, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Fötales Kälberserum (FBS)	PAA Laboratories, Pasching Österreich
Formaldehyd (37%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Substanz	Hersteller
Glycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
gp33 Peptid	AnaSpec, Fremont, Kalifornien, USA
Hanks balancierte Salzlösung (HBSS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Humanes Interleukin-2 (IL-2) (10000U/ml)	Novartis, Basel, Schweiz
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Isofluran	Abbvie, Ludwigshafen, Deutschland
LB-Agar (Lennox)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LE Agarose	BioRad, Hercules, California, USA
L-Glutamin	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Lyse/Fix Buffer (5x)	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Lysing Buffer (10x)	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Fluka, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Natriumorthovanadat (Na ₃ O ₄)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
NuPAGE Novex 12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 15 well	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
OVA (257-264)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Perm Buffer III	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Poly-L-Lysin	Sigma, St.Louis, Missouri, USA
Retronektin	Takara/Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA

Substanz	Hersteller
RetroX Concentrator	Takara/Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Roti-Block	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trinatriumphosphat (Na_3PO_4)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris-Hydrogen Chlorid Puffer (Tris-HCl)	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Trypanblau	Sigma, St.Louis, Missouri, USA
Trypsin-EDTA Lösung 0,05%	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Tween-20	Merck, Darmstadt, Deutschland

13.2 Verwendete Puffer und zusammengesetzte Lösungen

Tabelle 12 Puffer und zusammengesetzte Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Bovines Serum Albumin (BSA) 2 %	2 % BSA mit ddH ₂ O., steril filtriert, gelagert bei 4°C
BSA/PBS 10% Stammlösung	10 g BSA in 100 ml PBS
Chloroquine	25 µM mit ddH ₂ O, steril filtriert, gelagert bei 4°C
HEPES (2x)	281 mM NaCl, 100 mM HEPES, 5 mM Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O, pH 7.0, gelagert bei -20°C
PBS-T	0.05% Tween-20 in PBS
SDS 10%	25 g SDS in 250 ml ddH ₂ O
SDS loading buffer, 6x	60% (v/v) glycerin, 18% (w/v) SDS, 0.3% (v/v) bromophenol blue, 600 mM Tris-HCl, 12% (v/v) β-mercaptoethanol

Bezeichnung	Zusammensetzung
Transfer/Blotting Buffer	20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) TOWBIN Buffer
TOWBIN Buffer	144 g Glycin, 30.29 g Tris, 250 mg SDS

13.3 Verwendete Geräte

Tabelle 13 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage, BP61	Sartorius Stedim Biotec, Göttingen, Deutschland
Autoklav, VX-95	Systec, Wettenberg, Deutschland
Bildgebungssystem, Fusion-SL	peqLab, Erlangen, Deutschland
Blotting system, Criterion	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
CO2-Inkubator, HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Elektrophorese-System	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Fluoreszenz Mikroskope, Axioskop 2	ZEISS, Oberkochen, Deutschland
Flow Cytometer, MACSQuant	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Gefrierbehälter, Mister Frosty	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heißluftsterilisator	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Inhalationsnarkose-System	XGI-8, Caliper Life Science, Deutschland
In vivo Bildgebung, IVIS Lumina Series II	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
Mikroskop Olympus IX70	Olympus, Tokyo, Japan
Mikrowelle	Sharp, Osaka, Japan
Mini-Zell Elektrophorese System, XCell SureLock	Life Tehnologies, Darmstadt, Deutschland

Gerät	Hersteller
Nano-Drop ND 1000 Spectrometer	peqLab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	Knick, Berlin, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Schüttelinkubator	Edmund Bühler LabTec, Hechingen, Deutschland
Rotlichtlampe	Heiland, Hamburg, Deutschland
Sterilbank HERAsafe KS	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Deutschland
Spannungsquelle, Power Pac 300	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Thermocycler Mastercycler Pro	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tiefkühlschrank (- 80° C)	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
UV-Lampe	Konrad Benda, Wiesloch, Deutschland
Vortex	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
XGI-8 Anästhesiesystem	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
Zell-Sorter, BD FACSAria II	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Zentrifuge Heraeus Fresco 21, tabletop	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge, tabletop	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge, Biofuge 15R, tabletop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge Minifuge	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

13.4 Verbrauchsmaterial

Tabelle 14 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Augen- und Nasensalbe (Bepanthen)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Blotting Sandwich Immobilon	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Combitips Advanced (1, 5 and 10 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
C-Chip Neubauer <i>improved</i> Einmal Zählkammer	NanoEnTek, Seoul, Korea
Desinfektionsmittel (DesoMed Rapid AF)	DesoMed, Freiburg, Deutschland
Einmalspritzen (5, 10 und 20 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Einweghandschuhe	Braun, Melsungen, Deutschland
FACS-Röhrchen 5 ml, 75x12 mm, PS	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filter Top Zellkulturflaschen (25, 75 and 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Kryoröhrchen (2 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Microvette CB 300 µl, K2 EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nicht-Gewebe Kulturplatten (6 and 24 well)	Falcon, Corning, New York, USA
Pasteurpipetten	Corning, New York, USA
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 100, 200 und 1000 µl)	peqLab, Erlangen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,1; 0,2, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rundboden Röhrchen aus Polystyrol (5 ml)	Falcon, Corning, New York, USA
Serologische Pipetten (2, 5, 10 and 25 ml)	Costar, Corning, New York, USA
Skalpell No. 11	Feather, Japan
Sterilfilter (0,22 µm und 0,45 µm)	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Zellkulturplatte (10 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (6, 12, 24 and 96 well)	Costar, Corning, New York, USA
Zellsieb (100 µM)	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Zentrifugenröhrchen Falcon (15 und 50 ml)	Greiner-bio-one, Frickenhausen, Deutschland

13.5 Kommerzielle Kits

Tabelle 15 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
Annexin V Apoptosis Detection Kit	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Calcium Phosphat Transfektion Kit	Sigma, St.Louis, Missouri, USA
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
ECL-Plus Western Blot Kit	Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Encore Biotin Module labelling Kit	NuGEN Technologies, San Carlos, Kalifornien, USA
Fix & Perm Cell Permeabilization Kit	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed, Löhne, Deutschland
Ovation Pico WTA System V2 Amplification Kit	NuGEN Technologies, San Carlos, Kalifornien, USA
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quick Plasmid Miniprep Kit	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

13.6 Medien

Tabelle 16 Medien

Medien	Zusammensetzung
DMEM complete	DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FBS), 2% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
RPMI 1640 Mouse Special	RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum (FBS), 2% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren 1% Natriumpyruvat, 0,1% β -Mercaptoethanol
IMDM CTLL2	IMDM mit 10% fötalem Kälberserum (FBS), 2% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,1% β -Mercaptoethanol, 300U IL-2/ml.

13.7 Genotyp-Schlüssel E.coli

Tabelle 17 Genotyp-Schlüssel E.coli

Genotyp	Beschreibung
ara-14	Blockiert den Arabinosekatabolismus
argF	Ornithin-Carbamoyltransferasemutation blockiert die Fähigkeit Arginin zu nutzen
dam/dcm	Beseitigt endogener Adenin-Methylierungen in der GATC-Sequenz (dam) oder die Cytosin-Methylierung in der CCWGG-Sequenz (dcm). Wird eingesetzt zur DNA-Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen (z.B. Ava II, Bcl I)
DE3	Lysogen das die T7-RNA-Polymerase codiert. Wird angewendet zur induzierten Expression von T7-angetriebenen Expressionssystemen
endA	endA-Mutation in der nicht spezifischen Endonuklease I; eliminiert nicht-spezifische Endonukleaseaktivitäten, was die Plasmidpräparation verbessert
F'	Ein selbsttragendes, low-copy Plasmid (Plasmidkopienzahl zwischen 1 und 12 pro Zelle) zur Erzeugung von Einzelstrang-DNA, wenn mit M13-Phagen infiziert wird; enthält einen Resistenzmarker zur

Genotyp	Beschreibung
	Aufrechterhaltung und enthält häufig den lacZΔM15 Genotyp
galK	Galaktokinase-Mutation blockiert den Galaktosekatabolismus, - Zellen die galK negativ sind können in einem Medium auswachsen, welches Galaktose als Kohlenstoffquelle enthält
galU	Glukose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Mutation blockiert die Möglichkeit Galaktose zu nutzen; Zellen die galU negativ sind können in einem Medium auswachsen, welches Galaktose als Kohlenstoffquelle enthält
gyrA96	DNA-Gyrase-Mutation produziert Resistenzen gegen Nalidixinsäure
hsd	Mutationen im System der Methylierung und Restriktion, welche E.coli-DNA als fremd zu erkennen. Der hsd-Genotyp ermöglicht eine effiziente Umwandlung von DNA durch PCR
lacI	Codiert den lac-Repressor, welcher die Expression von Promotoren kontrolliert, die den lac-Operator tragen; IPTD bindet den lac-Repressor und unterdrückt den Promotor; wird häufig genutzt für Blau/Weiß-Screening oder als Kontrolle für die Expression rekombinanter Gene
lacY1	Blockiert die Nutzung von Laktose über eine β-D-Galaktosidase-Mutante
lacZ	β-D-Galaktosidase-Gen; Mutation ergibt farblose (gegen blaue) Kolonien in der Gegenwart von X-gal
lacZΔM15	Ein Element ist erforderlich für die β-Galaktosidase-Komplementierung, wenn sie auf X-gal ausgestrichen wird; wird in Blau/Weiß-Screens von Rekombinantien verwendet; in der Regel durch Lambdoid-Phagen φ80 oder FI übertragen
leuB	Benötigt Leucin zum Wachstum auf Minimalmedien über die β-Isopropyl-Malat-Dehydrogenase-Mutation
lon	Lon-Mangel in der Lon ATPase-abhängigen Protease; verringert den Abbau von rekombinanten Proteinen; alle B-Stämme tragen diese Mutation
mcrA, mcrBC, oder mrr	Mutationen, die erlauben das methylierte DNA nicht als fremd erkannt werden; dieser Genotyp ist notwendig, wenn genomische DNA oder methylierte cDNA kloniert wird
nupG	Mutation für den Transport von Nukleosiden

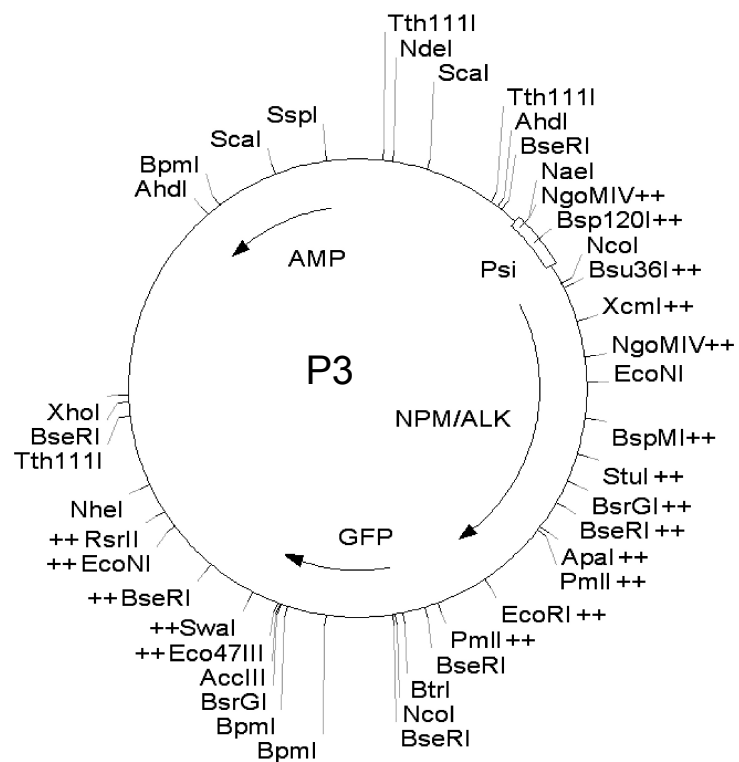
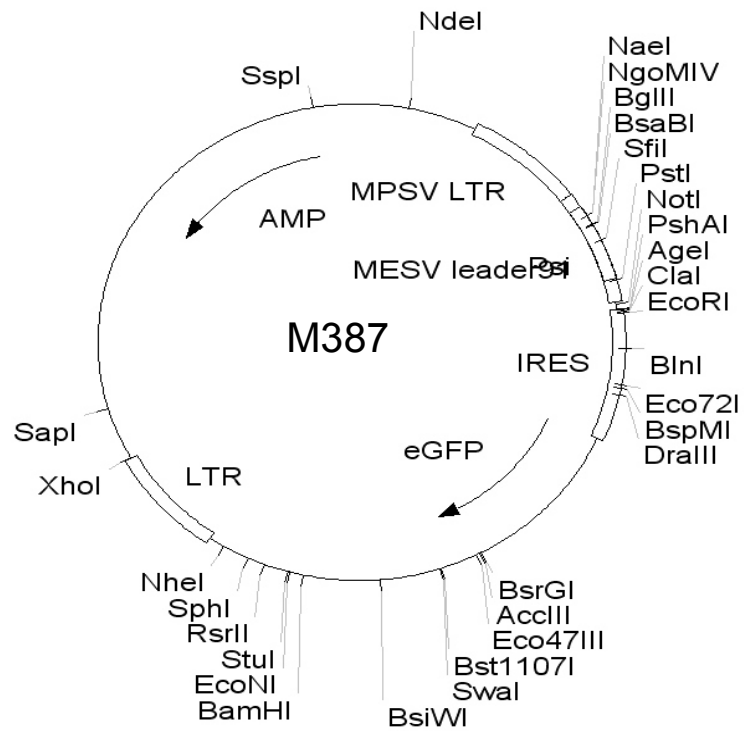
Genotyp	Beschreibung
ompT	Zeigt an, dass den E.coli eine äußere Membranprotease fehlt – reduziert den Abbau der Heterologie von Stämmen und die Rückgewinnung von intaktem, rekombinanten Protein ist in ompT-negativen Stämmen verbessert
P3	Ein 60-kb-low-copy-Plasmid, das Ampicillin und Tetracyclin Resistenzgene trägt mit einer amber-Mutation; wird am häufigsten eingesetzt für die Selektion von supF enthaltenden Plasmiden; trägt das Kanamycinresistenzgen für die Selektion
pLys	pLys-Plasmid, welches das T7-Lysozym codiert; wird eingesetzt zur Reduzierung der basalen Expression von T7-getriebenen Expressionssystemen durch die Inhibition des basalen Levels der T7-RNA-Polymerase
proAB	Benötigt Prolin zum Wachstum auf Minimalnährböden
recA	Die Mutation in einem Gen, welches allgemein verantwortlich ist für die Rekombination von DNA; ist besonders zu empfehlen, wenn ein Gen mit direkten Wiederholungen kloniert werden soll
relA	RNA wird in der Abwesenheit der Proteinsynthese synthetisiert. Der relA –Lokus reguliert die Kopplung zwischen Transkription und Translation. Im Wildtyp führt eine limitierte Aminosäurekonzentration zur Abschaltung der RNA-Synthese
rpsL	Resistenz gegen Streptomycin
supE,F	tRNA Glutamin-Suppressor
Thi-1	Benötigt Thiamin zum Wachstum auf Minimalnährböden
Tn10	Überträgt Tetrazyklinresistenz über Transposons
tonA	Überträgt Resistenzen über lytische Bakteriophagen T1, T5 und f80
traD, D36	Verhindert die Übertragung von F'-Episomen über eine Transferfaktormutation
tsx	Überträgt Resistenzen über T6-Phagen und Colicin-k
xyl-5	Blockiert den Katabolismus von Xylose

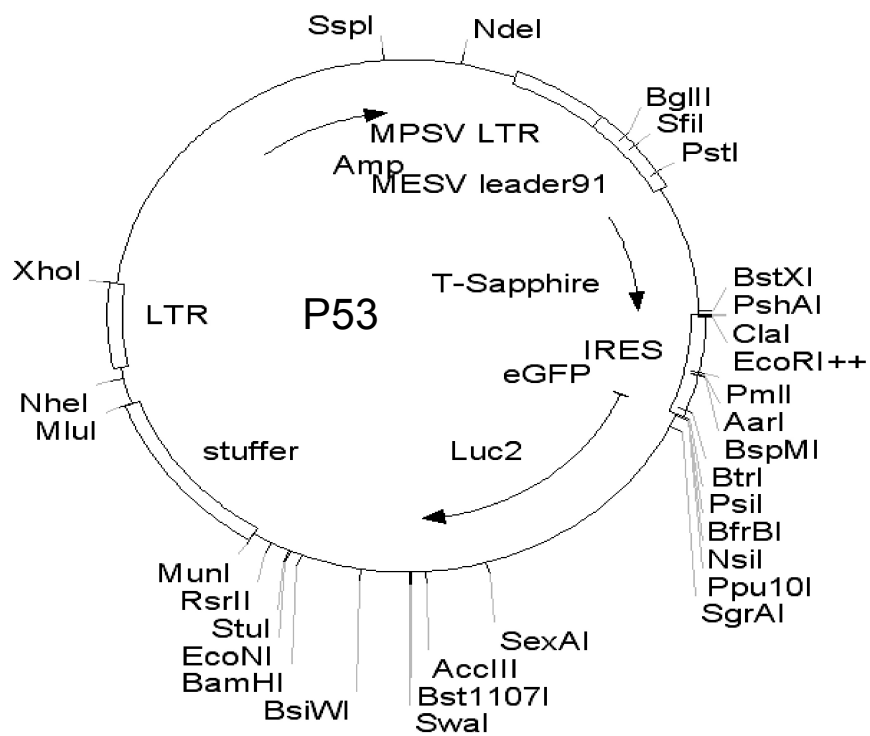
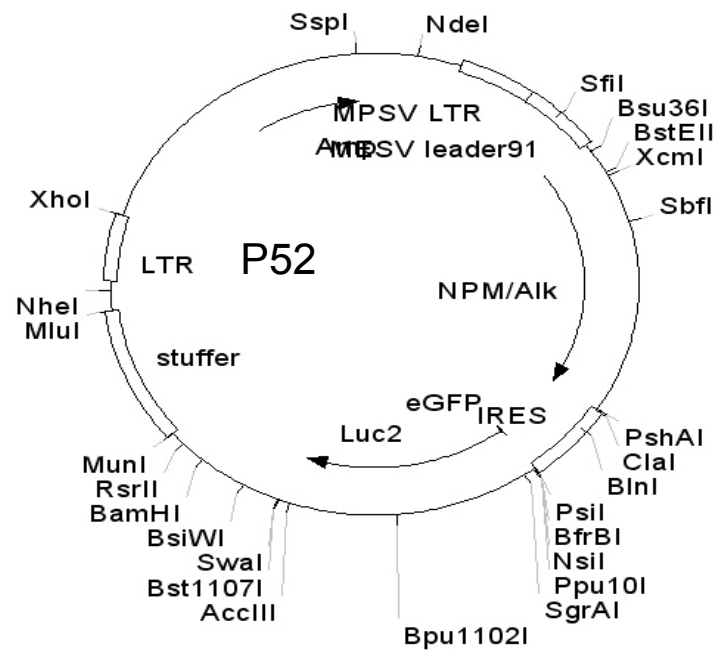
13.8 Legende Genexpressionsdaten

Tabelle 18 Legende Genexpressionsdaten

Abkürzung	Genname
Inhba	Inhibin beta A Kette
Adam9	Disintegrin und Metalloproteinase Domän-tragendes Protein 9
Cd40lg	CD40 Ligand
Cycs	Cytochrom c, somatisch
Casp6	Caspase 6
Adora3	Adenosinrezeptor 3
Dusp6	Duale spezifisches Proteinphosphatase 6
Jak2	Tyrosinproteinkinase JAK2
Adarb1	Doppelsträngige RNA-spezifische Editase
Akt2	RAC-beta Serin/Threonin Proteinkinase
IL6	Interleukin 6
Tnfrsf8	Tumornekrosefaktor Rezeptorsuperfamilie 8
Csrnp1	Cystein/Serinreicher Nuklearprotein 1
Gadd45g	Wachstumsunterdrückendes und DNA-beschädigendes, induzierbares Protein Gadd45 gamma
Smox	Spermineoxidase
Stat5a	Singaltransduzer und Aktivator Transkription 5A
Lif	Leukämie Inhibitorfaktor

13.9 Plasmidkarten





Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. M.-L. Hansmann möchte ich mich rechtherzlich bedanken für die Überlassung dieses spannenden Disserationsthemas und die Möglichkeit meine Dissertation am Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Frankfurt anzufertigen.

Frau Prof. Dr. C. Herden danke ich vielmals für die externe Betreuung meiner Dissertation seitens des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Sebastian Newrzela für seine Hilfestellung, die Interessanten wissenschaftlichen Diskussionen und das stets freundschaftliche Verhältnis. Auch danke ich für die Möglichkeit eigenen Ideen zu entwickeln und diese umsetzen zu können.

Meinen herzlichen Dank möchte ich der gesamten T-Cell Lymphoma Group unter der Leitung von Dr. Sebastian Newrzela aussprechen, insbesondere Dr. Kathrin Warner, Smaro Soworka und Dr. Dr. Benjamin Rengsl für die wundervolle Zeit mit Euch, die anregenden Gespräche und Diskussionen sowie dem stets fantastischen Arbeitsklima.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden von ganzem Herzen, dass sie immer an mich geglaubt und in jeder Lebenssituation unterstützt haben.